

Verstärkung des bystander Effektes von
Suizidgentherapeutika: Molekularbiologische
Charakterisierung von zellpermeablen HBV-TLM-
Cytosin Desaminase Fusionsproteinen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl.-Ing. Annett Hillemann, geb. Wetterney

geb. 04. April 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger
2. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
3. Prof. Dr. Georg Pauli

eingereicht: 19.01.2005

Datum der Promotion: 14.07.2005

*Für meinen Vater Dr. Ing. Horst Wetterney
und meine Söhne Tim Fabian und Jan Philip*

Abstract deutsch

Die Arbeit beschäftigt sich mit einem neuartigen proteinbasierten, suizidgentherapeutischen Ansatz zur sicheren und effektiven Behandlung von soliden Tumoren. Verwendet wurden zellpermeable Fusionsproteine des bakteriellen Enzyms Cytosin Desaminase, welches spezifisch die Umsetzung der inaktiven, nichttoxischen Prodroge 5-Fluorcytosin in den hochwirksamen, stark toxischen Wirkstoff 5-Fluoruracil katalysiert. Dieser bewirkt die selektive Zerstörung von Tumorzellen. Durch die Fusion der bakteriellen Cytosin Desaminase (bCD) mit der Sequenz des Zellpermeabilität vermittelnden Peptides HBV-Translokationsmotiv (TLM) des Hepatitis B-Virus (HBV) wurden zellpermeable *E.coli* Cytosin Desaminase Suizidfusionskonstrukte generiert. Für die bakteriell synthetisierten HBV-TLM-Fusionsproteine konnten eine Hexamerisierung sowie eine spezifische enzymatische Aktivität bei der Umsetzung von Cytosin zu Uracil, die vergleichbar mit dem wt-Protein waren. Bei Versuchen zur Internalisierung der zellpermeablen Fusionsproteine wurde für die Fusionsproteine bCD-HBV-TLM eine Aufnahme in das Zytoplasma von Hepatomzellen mittels konfokaler Laserscannmikroskopie und differentieller Zellfraktionierung nachgewiesen, nicht jedoch für die Fusionsproteine HBV-TLM-bCD. Die gezeigte Internalisierung des Proteins HBV-TLM-bCD erfolgte effizient und schnell und war unabhängig vom endosomalen Aufnahmeweg. Bei der nachgewiesenen Translokation blieb die enzymatische, suizidgentherapeutische Aktivität des zellpermeablen Suizidproteins (HBV-TLM-bCD) vollständig erhalten, so dass sich dieses Fusionsprotein für einen therapeutischen Einsatz in der Suizidgentherapie eignet. Zusätzlich zur antitumoralen Wirkung können durch einen gezielten, lokal begrenzten therapeutischen Einsatz der vorgestellten zellpermeablen bCD-HBV-TLM-Fusionsproteine starke Nebenwirkungen, wie sie bei einer konventionellen Chemotherapie zu beobachten sind, weitgehend vermieden werden.

Schlagworte: Cytosin Desaminase, Zellpermeable Peptide, Suizidgentherapie, Hepatozelluläres Karzinom-HCC

Abstract english

This work investigates the application of protein-based therapeutic suicide enzyme/prodrug approaches providing novel means for both safe and effective local therapeutic regimes in solid tumours.

The concept of the used suicide gene therapy system is based mainly on the transfer of the cell permeable bacterial suicide enzyme, cytosine deaminase, which specifically converts the inactive, non-toxic prodrug 5-fluorocytosine into the toxic metabolite 5-fluorouracil finally resulting in the efficient destruction of tumour cells. By employing a novel cell permeable peptide, known as the translocation motif (TLM) of hepatitis B virus (HBV), *E.coli* cytosine deaminase (bCD) suicide fusion proteins were generated. HBV-TLM fusion proteins formed hexamers (as do parental wt-bCD) and retained the specific enzymatic activity of cytosine conversion to uracil, also comparable to parental wt-bCD protein. However, only bCD-HBV-TLM fusion proteins, but not HBV-TLM-bCD fusion proteins were found to be taken up by the cytoplasm of target hepatoma cells as demonstrated both by confocal laser scanning microscopy and cell fractionation. Uptake of bCD-HBV-TLM worked both efficiently and rapidly and was found to be independent of the endosomal pathway. Since bCD-HBV-TLM fusion proteins completely retained their suicide enzymatic activity in the course of translocation across the plasma membrane, this suggests their usage as profound inducers of chemo-sensitivity to 5-fluorocytosine strongly.

Future therapeutic local application of cell permeable bCD-HBV-TLM fusion proteins together with a systemic 5-fluorocytosine prodrug application could result in profound antitumour activities without apparent side effects.

Keywords: cytosine deaminase, cell permeable peptides – CPP, suicide gene therapy, hepatocellular carcinoma – HCC

Inhaltsverzeichnis

0. Zusammenfassung	1
1. Einleitung	4
1.1. Hepatozelluläres Karzinom (HCC, Leberzellkrebs)	4
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	4
1.1.2. Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines HCC	5
1.1.2.1. Hepatitis B-Virusinfektion	5
1.1.2.2. Hepatitis C-Virusinfektion (HCV)	6
1.1.3. Prognose und Diagnose	7
1.1.4. Therapeutische Optionen	8
1.1.4.1. Leberresektion, Orthotope Lebertransplantation (OLT)	8
1.1.4.2. Transarterielle Chemoembolisation (TACE)	9
1.1.4.3. Radiofrequenzablation (RFA)	9
1.1.4.4. Perkutane Alkoholinjektion (PAI)	10
1.1.4.5. Chemotherapie	10
1.2. Gentherapie von hepatozellulärem Karzinom	11
1.2.1. Gentransfer-Systeme	12
1.2.1.1. Virale Vektoren	13
1.2.1.2. Nicht-viraler Gentransfer	15
1.3. Suizidgentherapie	15
1.4. Cytosin Desaminase aus E.coli und ihre suizidgentherapeutische Wirkung	17
1.5. Interzellulärer Transport mit zellpermeablen Peptiden	21
1.5.1.1. Das Hepatitis B-Virus-Translokationsmotiv (HBV- <i>TLM</i>)	22
2. Zielsetzung	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Materialien	25
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel	25
3.1.2. Enzyme	27
3.1.3. Blotmembranen / Filme	27
3.1.4. Antikörper	28
3.1.5. Materialien für die Zellkultur	28
3.1.6. Längenstandards	29
3.1.7. Verwendete Kits	29
3.1.8. Plasmide	29
3.1.9. Oligonukleotide	31

3.1.10. Zelllinien und Bakterienstämme	32
3.1.11. Geräte	33
3.1.12. Puffer und Lösungen	35
3.2. Methoden	38
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
3.2.1.2. Colony-PCR zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone	39
3.2.1.3. Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	41
3.2.1.4. Sequenzierung doppelsträngiger DNA	42
3.2.1.5. Maxipräparation von Plasmid-DNA	42
3.2.1.6. Mini-Präparation von Plasmid-DNA zur Charakterisierung transformierter Bakterien	43
3.2.1.7. Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	44
3.2.1.8. Isopropanol-Fällung von DNA	44
3.2.1.9. Reinigung von PCR-Reaktionsprodukten	45
3.2.1.10. Reinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen	45
3.2.1.11. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	46
3.2.1.12. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	46
3.2.1.13. Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA	47
3.2.1.14. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	47
3.2.1.15. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	48
3.2.2. Zellbiologische Materialien und Methoden	48
3.2.2.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	48
3.2.2.2. Anlegen von Glycerolkulturen	49
3.2.2.3. Induktion der Biosynthese prokaryontischer Proteine	49
3.2.2.4. Homogenisierung und Zellaufschluss von Bakterien	51
3.2.2.5. Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen	52
3.2.2.6. Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	53
3.2.2.7. Auftauen von Zellen	53
3.2.2.8. Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Neubauer Hämocytometer	54
3.2.2.9. Liposomale Transfektion von adhärenenten Zellen	54
3.2.2.10. Selektionierung auf stabile Expression und Isolierung resistenter Klone	55
3.2.2.11. Proliferationstest: Sulforhodamin B (SRB)-Test	55
3.2.2.12. Isolierung genomischer DNA	57

3.2.2.13. Präparation von Gesamtproteinextrakt	57
3.2.2.14. Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation	58
3.2.3. Proteinchemische Methoden	59
3.2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorptions-spektrometrie	59
3.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	60
3.2.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	60
3.2.3.4. Coomassie-Färbung	61
3.2.3.5. Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	62
3.2.3.6. Ponceau S-Färbung	63
3.2.3.7. Westernblotting	63
3.2.3.8. Elektrotransfer im semi-dry-Verfahren	63
3.2.3.9. Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers	64
3.2.3.10. Visualisierung: ECL-Detektionssystem	65
3.2.3.11. Intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung für die FACS-Analyse	65
3.2.3.12. Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie	66
3.2.3.13. Dialyse von Proteinlösungen	67
3.2.3.14. Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie	68
3.2.3.15. Gelfiltrationschromatographie	69
3.2.3.16. Affinitätschromatographie mit ligandgebundener Matrix zur Reinigung von Antikörpern	69
3.2.3.17. Erzeugung polyklonaler Antikörper	71
4. Ergebnisse	72
4.1. Prokaryontische Fusionsproteine	72
4.1.1. Biochemische Charakterisierung prokaryontisch hergestellter Suizidproteine	72
4.1.1.1. Subklonierung	72
4.1.1.2. Prokaryontische Plasmidkonstrukte	72
4.1.1.3. Nachweis der Synthese prokaryontischer Fusionsproteine	74
4.1.1.4. Reinigung prokaryontischer Fusionsproteine	76
4.1.1.5. Herstellung von polyklonalen bCD-spezifischen Antikörpern	80
4.1.2. Proteinchemische und funktionelle Charakterisierung prokaryontischer Fusionsproteine	85
4.1.2.1. Bestimmung des Molekulargewichtes und des Oligomerisierungszustandes	85

4.1.2.2. Photometrischer Test zur Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität der prokaryontischen Fusionsproteine	87
4.1.2.3. Etablierung eines Nachweises zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von bCD-Fusionsproteinen über Reversed Phase Chromatographie	89
4.1.3. Nachweis der Zellpermeabilität prokaryontischer Fusionsproteine	93
4.1.3.1. Western-Blot-Analyse subzellulärer Fraktionen nach differentieller Zentrifugation zum Nachweis der Translokalisierung	93
4.1.3.2. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der Internalisierung und Lokalisation von zellpermeablem Fusionsprotein bCD-HBV- <i>TLM</i> -6His in Hepatomzellen	95
4.2. Eukaryontische Plasmidkonstrukte	99
4.2.1. Subklonierung	99
4.2.2. Proteinchemische und funktionelle Charakterisierung der mit bCD-Fusionskonstrukten stabil transfizierten Hepatomzellen	100
4.2.2.1. Nachweis der Integration in das Genom	100
4.2.2.2. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Proteinexpression von Fusionsproteinen nach stabiler Transfektion	102
4.2.2.3. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung und intrazelluläre FACS-Analyse von eukaryontisch gebildeten Fusionsproteinen zum Nachweis der Proteinbiosynthese	103
4.2.2.4. Funktionalität der eukaryontischen Fusionsproteine	107
4.2.2.5. Nachweis einer katalytischen Aktivität im Gesamtzelllysat transfizierter Hepatomzellen	110
4.2.3. Nachweis der Zellpermeabilität eukaryontischer Fusionsproteine	112
4.2.3.1. Quantifizierung einer durch HBV- <i>TLM</i> vermittelten Zellpermeabilität und Überprüfung der Funktionalität nach dem Export der Fusionsproteine aus den primär produzierenden Zellen	112
5. Diskussion	115
Literaturverzeichnis	133
Abkürzungsverzeichnis	152
Danksagung	155
Erklärung	156

0. Zusammenfassung

Ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von malignen, nicht operablen Lebererkrankungen, die mit konventionellen Therapieformen nur unbefriedigend behandelt werden können, stellt die Suizidgentherapie dar. Das Wirkungsprinzip der Suizidgentherapie basiert auf der Einschleusung von körperfremden „Selbstmordgenen“ (Suizidgenen) in das Zielorgan, wo sie nach Expression und Proteinbiosynthese systemisch verabreichte nichttoxische Substrate (sog. *prodrugs*) in hochtoxische Wirkstoffe umsetzen oder deren Umsetzung katalysieren. Diese gebildeten Wirkstoffe ermöglichen die selektive Zerstörung der entarteten Zellen. Limitierend bei der für eine erfolgreiche Suizidgentherapie erforderlichen Übertragung des körperfremden Suizidgens erweisen sich die mit den verfügbaren Gentransfersystemen erreichten Transfereffizienzen. Selbst unter optimalen Bedingungen können bisher nicht mehr als 10% der Hepatozyten erreicht werden.

Eine Möglichkeit zur Kompensation der geringen Transferraten bietet die Tatsache, dass toxische Wirkstoffe, gebildet in den gentechnisch veränderten Tumorzellen, in nicht transduzierte Nachbarzellen diffundieren und deren Eliminierung ermöglichen (*bystander* Effekt).

Ziel der Arbeit war die Verstärkung dieses sog. *bystander* Effektes in Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC).

Erreicht werden sollte die angestrebte Verstärkung durch die Fusion eines Suizidgens mit der Sequenz des Zellpermeabilität vermittelnden Peptides HBV-Translokationsmotiv aus der PräS2-Domäne der Oberflächenproteine des Hepatitis B-Virus. Zusätzlich zum *bystander* Effekt sollte so die Ausbreitung (*spreading*) des synthetisierten Suizidproteins aus den transduzierten HCC-Zellen in die umliegenden Lebertumorzellen erreicht werden, um diese ebenfalls zur Bildung des toxischen Wirkstoffs zu befähigen.

Als Modellgen wurde das für die bakterielle Cytosin Desaminase (bCD) codierende Gen ausgewählt, welches nach Expression die Desaminierung von 5Fluorcytosin (5FC) zu toxischem 5Fluoruracil (5FU) katalysiert. Im weiteren Reaktionsverlauf entstehen aus dem gebildeten 5FU drei aktive Metabolite: Fluoruridintriphosphat (FUTP), Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und Flu-

ordesoxyuridintriphosphat (FdUTP). Diese stören den endogenen Nukleotidstoffwechsel der Zielzelle, inhibieren die RNA-Synthese und führen zum Abbruch der DNA-Synthese während der S-Phase des Zellzyklus. Dies führt insbesondere bei schnell proliferierenden Zellen, wie den Leberkrebszellen, zur Apoptose.

Für die Versuche wurden prokaryontische und eukaryontische Expressionskonstrukte hergestellt. Die synthetisierten prokaryontischen Fusionsproteine wurden gereinigt und hinsichtlich ihrer strukturellen und enzymatischen Voraussetzungen für den Einsatz in der Suizidgentherapie des hepatozellulären Karzinoms charakterisiert. Nach externer Zugabe von enzymatisch aktiven rekombinanten Fusionsproteinen zu Hepatomzelllinien war das prokaryontisch synthetisierte bCD-Fusionsprotein mit carboxyterminal fusioniertem HBV-*TLM* in der Lage, sehr effizient in das Cytosol von HCC-Zellen zu translokalisieren. Für dieses bCD-Fusionsprotein konnte somit eindeutig der Nachweis der angestrebten HBV-*TLM*-vermittelten Zellpermeabilität erbracht werden.

Mittels des eukaryontischen Produktionssystems gelang es ebenfalls, einen gegenüber dem Wildtyp(wt)-bCD-Protein verstärkten Transport des enzymatisch aktiven bCD-HBV-*TLM*-Fusionsproteins aus transfizierten Zellen nachzuweisen. Somit war die Voraussetzung für ein interzelluläres *spreading* gegeben.

Eine interzelluläre Ausbreitung zellpermeabler bCD-Fusionsproteine zwischen primär transduzierten und nicht transduzierten Tumorzellen konnte in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch nicht untersucht werden, da der Nachweis der Transduktion von bCD-exprimierenden Tumorzellen mit den affinitäts-gereinigten Antikörpern aufgrund mangelnder Sensitivität nicht gelang.

Entscheidende Bedeutung sowohl beim Transport aus transduzierten HCC-Tumorzellen als auch bei der Internalisierung von prokaryontischen Fusionsproteinen hatte die Positionierung des zellpermeablen Peptids. Während das Protein bCD-HBV-*TLM* eine deutliche Steigerung der Transfereffizienz gegenüber dem wt-Protein aufwies, konnte mit dem HBV-*TLM*-bCD als Fusionskonstrukt kein Transport in oder aus Tumorzellen beobachtet werden. Die mit diesem Fusionsprotein erreichten Transferraten lagen sogar noch unter dem geringfügigen Transfer, der bei dem wt-Protein beobachtet wurde.

Die in der vorliegenden Dissertation dargelegten Ergebnisse zeigen, dass durch zellpermeable Suizidproteine, fusioniert mit dem HBV-*TLM*, prinzipiell eine ver-

stärkte interzelluläre Ausbreitung des enzymatisch aktiven Proteins möglich ist. Da die Wirkung der bCD als Suizidprotein bei verschiedenen malignen Erkrankungen, wie z.B. Fibrosarcom, Adenosarcom, Gliosarcom und Hepatozelluläres Karzinom, bereits nachgewiesen ist, kann das untersuchte Suizidgentherapie-system durch den zusätzlichen, auf Zellpermeabilität basierenden, interzellulären Proteintransfer dazu beitragen, dem unzureichenden Gentransfer effektiv entgegenzuwirken und so zu einer Erhöhung der Wirksamkeit der bCD als Suizidprotein führen.

1. Einleitung

1.1. *Hepatozelluläres Karzinom (HCC, Leberzellkrebs)*

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist klinisch ein vom Lebergewebe ausgehender hochmaligner Tumor mit langem asymptomatischen Wachstum und limitierten therapeutischen Möglichkeiten. Mit jährlich ca. einer Millionen Neuerkrankungen und 250.000 Todesfällen ist das HCC der 8-häufigste (bei Männer der 7-häufigste, bei Frauen der 9-häufigste) maligne Tumor weltweit (Busuttil & Fraimer 1996). In den USA erkrankten zwischen 1976-1980 1,4 pro 10.000 Männer, im Zeitraum 1991-1995 dagegen schon 2,4 pro 10.000 Männer. Solche Erhebungen zeigen, dass für die kommenden Jahre mit einer Zunahme der Neuerkrankungen gerechnet werden muss. Ursache dafür könnten die verstärkte Inzidenz von Hepatitis C-Viruserkrankungen der vergangenen Jahrzehnte sein, da die Folgen wie Zirrhose und HCC erst nach langen Latenzzeiten auftreten (Benvegnú and Alberti 2001). In den entwickelten Ländern lag der Erkrankungsgipfel jenseits des 6., meist im 8. Lebensjahrzehnt. Neuere Studien belegen jedoch, dass sich die altersbedingte Inzidenz für die Erkrankung seit einigen Jahren in Richtung jüngere Menschen (40-60 Jahre) verschiebt (El-Serag et al. 1999, Hussain et al. 2001). Unterschiede sind vor allem in der geographischen Inzidenz zu beobachten. So tritt, mit 20-100 Fällen pro 100.000 Einwohner, das HCC in Südostasien und Afrika wesentlich häufiger auf als z.B. in Deutschland, wo jährlich 3-5 Fälle pro 100.000 Einwohner registriert werden (Idilman et al. 1998, Sterneck 2000, Wang et al. 2002). Bei der Mehrzahl der Erkrankten (80%) entwickelt sich der Tumor auf der Grundlage einer chronischen Leberentzündung (Leberzirrhose). Patienten mit einer zirrhotischen Leber unterliegen in den ersten 5 Jahren einem 2%igen und in den ersten 10 Jahren einem 3,5%igen Risiko ein HCC zu entwickeln (Benvegnú and Alberti 2001). Diskutiert wird, ob ein durch den chronischen Entzündungsreiz bedingter erhöhter Zellumsatz über eine Anhäufung genetischer Mutationen direkt zur Neubildung von HCC führen könnte oder indirekt die Sensibilität der Hepatozyten gegenüber

Umweltkarzinogenen erhöht wird (Sterneck 2000). Das Risiko für die Entstehung eines HCC hängt jedoch nicht nur vom Stadium der Leberzirrhose, sondern auch von der Art der zugrunde liegenden Lebererkrankung ab. Europaweit stellen die chronische Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion mit über 50% und die Hepatitis B-Virus (HBV)-Infektion mit ca. 15% die häufigsten Ursachen des HCC bei Zirrhose dar, gefolgt vom Alkoholmissbrauch mit ca. 5% (Colombo 1998) und Aflatoxin B-Exposition. Eine HBV-HCV-Koinfektion erhöht das HCC-Risiko insbesondere in einer nicht zirrhotischen Leber (Kubo et al. 1999), während sich die kumulativen Inzidenzen für die Einzelerkrankungen ähnlich verhalten. Betrachtet man jedoch bei beiden ätiologischen Gruppen die jährliche Inzidenz, so kann man deutliche Unterschiede im Erkrankungsrisiko beobachten. Bei HCV-Patienten nimmt das jährliche Risiko für die Entwicklung eines HCC von 2% in den ersten Jahren auf 4% in den späteren Jahren zu, während sich bei HBsAg positiven Patienten dieser Trend umkehrt (Benvegnú and Alberti 2001).

1.1.2. Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines HCC

1.1.2.1. Hepatitis B-Virusinfektion

Das Hepatitis B-Virus (HBV) ist eines der kleinsten humanpathogenen DNA-Viren und gehört mit seinem teilweise doppelsträngigen Genom zu den *Orthohepadnaviren*. Es zeichnet sich durch einen strikten Lebertropismus (Nowoslawski et al. 1972, Johnson et al. 1978, Mason et al. 1980) aus und verursacht bei Menschen akute und chronische Formen einer Leberentzündung. Bei einer Infektion können Fragmente der viralen DNA in das humane Genom integrieren. Diese ungerichtete Integration wird begleitet von Mutationen, Deletionen und Translokationen (insertionelle Mutagenese), die sich auf Differenzierung und Zellwachstum auswirken können (Idilman et al. 1998). Eine Rolle bei der Entstehung des HCC scheint auch das X-Protein des Hepatitis B-Virus zu spielen, welches regulatorische Funktionen in der transkriptionellen Aktivierung zellulärer und viraler Gene und transaktivierende Eigenschaften innerhalb verschiedener Signalkaskaden besitzt (Überblick in Arbuthnot et al. 2000). Über die Bindung an das p53-Tumorsuppressorprotein kann das X-Protein dessen Transakti-

vatorfunktion hemmen, so dass die Expression p53-abhängiger Gene, die an DNA-Reparaturvorgängen, der Regulation des Zellzyklus und der Einleitung der Apoptose beteiligt sind, verhindert wird (Wang et al. 2002, Nita et al. 2002, Modrow et al. 2003). Außerdem schafft die sich ständig wiederholende, durch die chronische Infektion bedingte Apoptose/Nekrose mit anschließender Zellregeneration günstige Voraussetzungen für Mutationen (Koike et al. 2002, Nita et al. 2002). Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass bei Patienten mit einer chronisch persistierenden Hepatitis B-Virusinfektion ein 200-300fach erhöhtes Risiko besteht (Maynard 1990, Modrow et al. 2003), ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln. Pro Jahr sterben weltweit ca. 0,7-0,8 Millionen Menschen an HBV assoziiertem HCC.

1.1.2.2. Hepatitis C-Virusinfektion (HCV)

Patienten mit einer durch eine chronische Hepatitis-C-Virusinfektion bedingten Zirrhose tragen ein noch höheres Risiko als Patienten mit HBV-Infektion, ein Malignom in der zirrhotischen Leber zu entwickeln. Folge einer HCV-Infektion ist die Leberentzündung mit Zellnekrosen, wobei die Zellschäden vor allem durch die Immunreaktion ausgelöst werden. Bei bis zu 80% aller Infizierten entstehen chronisch-persistierende Hepatiden mit der Bildung von Karzinomen als Spätfolge. Weltweit schätzt man die Zahl der chronisch infizierten Patienten auf 170 Millionen Menschen (Modrow 2003). Ihr HCC-Risiko liegt bei jährlich 1,5-7% (Fattovich et al. 1997, Koike et al. 2002). Insgesamt entwickeln 2-7% aller Patienten mit chronischer HCV-Infektion nach 20 Jahren ein HCC (Di Bisceglie 1999). Auf welche Weise das HCV die Entstehung von Karzinomen fördert, ist umstritten. Da das Genom des Hepatitis C-Virus aus einzelsträngiger RNA besteht, kann eine insertionelle Mutagenese als Initiationsereignis für die Entstehung von HCV-assoziierten Karzinomen ausgeschlossen werden. Diskutiert werden der Einfluss des jahrelang andauernden Entzündungsprozesses und die damit verbundene Infiltration von immunologisch aktiven Zellen. Dabei auftretende Mutationen im Genom der Zelle könnten die Ursache für die andauernde Proliferation sein (Idilman et al. 1998, Modrow et al. 2003). Karzinogenes Potential wird auch dem HCV-Core (Koike et al. 2002) und den Nichtstrukturproteinen

NS3 und insbesondere NS5A zugeschrieben. Für das Protein p70, welches durch die NS3-Region codiert wird, wurde eine Aktivität als Helikase nachgewiesen, die zu genomischen Instabilitäten und Mutationen bei der Rekombination führen könnte (Takamisawa et al. 1991). Um die Inzidenzrate des HCC zu senken, bleibt auch hier z.Z. die wichtigste Maßnahme, die Grunderkrankung, die Hepatitis C-Virusinfektion, möglichst frühzeitig und effektiv, z. B. mit einer Kombinationstherapie von Interferon alpha und dem antiviralen Medikament Ribavirin, zu behandeln. Das langfristige Ziel ist die Entwicklung eines Impfstoffes, um der HCV-Infektion vorzubeugen.

1.1.3. Prognose und Diagnose

Das hepatozelluläre Karzinom steht als Ursache für die durch Krebs bedingte Mortalität bei den Männern an dritter und bei den Frauen an siebenter Stelle (Hussain et al. 2001). So versterben beispielsweise jährlich etwa 0,8 Millionen Menschen weltweit an HBV-assoziiertem HCC, die Tendenz ist steigend. Die Prognose ist im Wesentlichen von der Tumorgroße, seiner Lage, der noch verbliebenen Leberfunktion und den Tumormarkern abhängig. Prognostisch mitbestimmend ist, ob potentiell kurative Verfahren zur Anwendung kommen können. Darüber entscheiden nicht zuletzt der Gesamtzustand des Patienten (Alter, Begleiterkrankungen, Alkoholabusus) und die zugrunde liegende Lebererkrankung. Bei Patienten mit kleineren Tumoren beträgt die mittlere Überlebensdauer nach 1, 2 und 3 Jahren 81, 56 und 28% (Llovet et al. 1999). Bei Patienten mit diagnostiziertem, intrahepatischen HCC größer als 5 cm, mit mehr als 3 Knoten, Gallenwegs- oder Gefäßinfiltration, fehlender Tumorkapsel oder niedrigem Differenzierungsgrad ist die Prognose mit einer mittleren Überlebensdauer von ca. 6 Monaten äußerst negativ. HCC's weisen grundsätzlich eine Tendenz zu intrahepatischer Ausbreitung auf. Bei einer Entwicklung extrahepatischer Fernmetastasen (vor allem in Knochen und Lunge) muss mit einer weiteren Verschlechterung der Prognose und der Einschränkung der sinnvollen therapeutischen Optionen gerechnet werden. Die mittlere Überlebensdauer für Patienten mit initialer Fernmetastasierung beträgt unbehandelt 3-5 Monate (Grothey et al. 1997). Erste Hinweise auf ein HCC geben stark erhöhte Serumwerte des Tumormarkers

alpha-Fetoprotein (AFP), der 80-90% aller Karzinome in Ländern mit hoher und 50-70% aller Karzinome mit niedriger HCC-Inzidenz erfasst (Kew 1989) und ansonsten nur in embryonalen und nicht in adulten Hepatozyten nachzuweisen ist. Mittels Sonographie können HCC-verdächtige Herdbildungen ab einer Größe von 2-3 cm detektiert werden. Ein für die HCC-Suche unverzichtbares Verfahren ist die Kontrastmittel-Ultraschalluntersuchung, mit der in der früharteriellen Phase Herde erkannt werden, die sonst nicht nachweisbar sind. Mittels Ultraschall-Angionese können durch einen Katheder Kontrastmittel selektiv in das zum HCC führende arterielle Gefäß injiziert und eine Anreicherung des Kontrastmittels im Tumor verfolgt werden. Ein ebenfalls sehr aussagekräftiges Diagnostikverfahren ist die Computertomographie mit Kontrastmittel, wobei sich die arteriell durchbluteten HCC's anfärben und länger kontrastiert bleiben als das umgebende Lebergewebe.

1.1.4. Therapeutische Optionen

1.1.4.1. Leberresektion, Orthotope Lebertransplantation (OLT)

Als potenziell kurative Therapie für Patienten mit hepatozellulärem Karzinom steht eine Leberresektion zur Verfügung. Aufgrund des langsamen Spontanzwachstums bei fehlender Symptomatik liegt die Tumorverdopplungszeit zwischen 27 und 605 Tagen (Sama et al. 1992). Eine Erkrankung kann jedoch oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden und nur etwa 20% der HCC's sind bei Diagnosestellung als kurativ resektabel einzustufen (Grothey et al. 2000). Voraussetzung für die Anwendung einer Resektion ist, dass die Funktion des verbleibenden Leberrestes nach Resektion noch für eine Regeneration ausreicht, wobei die häufig zirrhotische Leber die Fähigkeit zur Regeneration mit dem Ausmaß des Zirrhosegrades verliert. Postoperativ treten in 30-80% vor allem intrahepatische Rezidive auf, die nur in 20-30% einer Nachresektion zugeführt werden können (Hanazaki et al. 2000). Die Fünfjahresüberlebensrate schwankt nach wiederholter Hepatektomie zwischen 10-50% (Sugimachi et al. 2001). Als alternatives chirurgisches Behandlungskonzept wird die orthotrophe Lebertransplantation (OLT) diskutiert. So können bei kleinen

HCC's nach vollständiger Hepatektomie mit OLT Langzeitüberlebensraten von 90% erreicht werden. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen und den damit verbundenen Wartezeiten mit Tumorprogression, der Gefahr einer erhöhten Rezidivrate unter Immunsuppression sowie der Notwendigkeit einer dauerhaften Immunsuppression wird die Hepatektomie mit OLT nur in Ausnahmefällen angewendet.

1.1.4.2. Transarterielle Chemoembolisation (TACE)

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) stellt ein palliatives Verfahren zur Behandlung nicht operabler HCC-Patienten dar, bei der die besondere Blutversorgung von HCC's, die zu fast 80% über die *Arteria hepatica* (normales Lebergewebe: 75% über die Pfortader, 25% über die *A. hepatica*) erfolgt, ausgenutzt wird. Über die Leistenarterie wird eine ölige Emulsion aus Trägersubstanz (Lipidol) und Chemotherapeutikum injiziert. Nach einer Anreicherung in den Tumorzellen (Lipidol als ölige Substanz mit temporär okkludierender Wirkung besitzt eine Affinität zum HCC) erfolgt die Embolisation der Tumorgefäße, um die Verweildauer und Konzentration des Zytostatikums zu erhöhen. Dabei entsteht infolge der Embolisation eine Ischämie (örtliche Blutleere) und zusätzlich Tumorzellnekrose (Allgaier et al. 2003). Die Daten zur Überlebenszeit sind sehr widersprüchlich. Hinzu kommt das sog. „Post-Embolisations-Syndrom“, bei dem neben dem Anstieg der Entzündungsparameter bzw. der Transaminasen, Erbrechen und Temperaturanstieg mit einer allgemeinen Verschlechterung der Leberfunktion gerechnet werden muss. Kontraindikationen sind ein Tumorbefall von mehr als 75% des Lebervolumens, Fernmetastasen sowie eine Leberinsuffizienz (Leberkoma). Eine TACE kommt daher für HCC-Patienten mit einer Tumorgroße mit mehr als 10 cm und einer bereits stark eingeschränkten Leberfunktion (Serumalbumin \leq 35 g/l) nicht in Betracht (Poon et al. 2000).

1.1.4.3. Radiofrequenzablation (RFA)

Bei der Radiofrequenzablation wird nach lokaler Anästhesie ultraschallgesteuert eine Nadel in den Tumorherd eingebracht. Durch einen Radiofrequenz-

Generator wird Wechselstrom von ca. 500 kHz erzeugt und zu der Nadel geführt, von wo aus der Strom zu einer auf der Haut angebrachten Neutralelektrode fließt. Um die Nadelspitze wird so eine Ionenbewegung induziert, die eine lokale Hyperthermie und damit eine Koagulationsnekrose erzeugt (Steiner et al. 2000). Bei nicht infiltrierenden Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als 3 cm konnte mit der RFA bei bis zu 98% der Patienten eine vollständige Nekrose erreicht werden (Lin and Lin, 2003). Ausschlusskriterien sind auch hier ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Fernmetastasierung und schwere Zirrhosen (Livraghi et al. 2000 and 2003).

1.1.4.4. Perkutane Alkoholinjektion (PAI)

Die perkutane Alkoholinjektion ist ein komplikationsarmer, primär palliativer Therapieansatz für Patienten mit maximal 3 Tumorherden mit einem Durchmesser bis zu 4 cm. Nach perkutaner, ultraschallgesteuerter Injektion diffundiert der Alkohol in das Tumorgewebe und erzeugt lokal eine Koagulationsnekrose. Stichkanal-Metastasen kommen selten vor, da der in den Punktionskanal zurücklaufende Alkohol nach Entfernen der Nadel die Aussaat von Tumorzellen verhindert. Die Fünfjahresüberlebensrate nach PAI von kleineren Tumoren liegt bei bis zu 39% (Shiina et al. 2002) und ist damit vergleichbar mit Ergebnissen nach einer Leberresektion. Patienten mit großen, diffus infiltrierend wachsenden oder multifokalen HCC kommen für diese Therapie nicht in Frage (Brunken et al. 2000).

1.1.4.5. Chemotherapie

Bedingt durch die spezifische Funktion der Leber als Entgiftungsorgan, die eine Vielzahl von Detoxifikationsenzymen bildet, zeigen primäre hepatozelluläre Karzinome eine ausgeprägte Chemotherapie-Resistenz gegenüber klassischen, systemischen Chemotherapieansätzen, die oft durch eine erheblich reduzierte Apoptosekapazität - 50% p53-Mutationen (Honda et al. 1998, Ozturk 1991, Bressac et al. 1991) - verstärkt werden.

1.2. *Gentherapie von hepatozellulärem Karzinom*

Aufgrund der schlechten Prognose nicht resektabler Karzinome und unzureichender palliativer Therapieansätze wird nach alternativen Verfahren für die Behandlung des hepatozellulären Karzinoms gesucht. Ein Ansatz ist die Gentherapie, bei welcher der grundlegende Wirkmechanismus zwar mit einer medikamentösen Therapie vergleichbar ist, jedoch auch grundsätzliche Unterschiede aufweist. So muss bei der Gentherapie im Gegensatz zur konventionellen medikamentösen Therapie, bei der unmittelbar nach Aufnahme die Medikamentenwirkung direkt in der Zielzelle angestrebt wird, das eingebrachte genetische Material im Zielorgan zunächst exprimiert werden. Das gebildete Protein stellt dann den Wirkmechanismus dar, in dem es in Stoffwechselvorgänge oder in die Signaltransduktionswege der Tumorzelle eingreift bzw. diese so modifiziert, dass es zu einem Absterben der Zelle und zur Regression des Tumors kommt. Durch die Transgen-Expression direkt am Zielort können systemische Nebenwirkungen gering gehalten werden und eine endogen regulierte und damit physiologische Therapie wird möglich. Die gentherapeutischen Ansätze für die Behandlung von HCC lassen sich grundsätzlich einer der folgende Therapieformen zuordnen (Ruiz et al. 1999 & 2001, Mohr et al. 2002, Wong et al. 2002):

- die Suizidgentherapie, bei der durch einen gezielten Transfer und die Expression von Genen, die für körperfremde Enzyme kodieren, eine Umsetzung nichttoxischer Substanzen (*prodrug*) in hochtoxische Wirkstoffe spezifisch in den Tumorzellen erfolgt,
- die Immunogentherapie, bei der das Immunsystem bei der Eliminierung von malignen Zellen unterstützt wird, die einerseits nur geringe Mengen MHC-Komplexe exprimieren, so dass es nicht zu einer Aktivierung der Lymphozyten kommt und die andererseits immunsuppressive Faktoren oder Cytokine wie TGF- β produzieren, um eine Aktivierung der T-Zellen bzw. ein Einwandern der Immunzellen in Tumore zu verhindern,
- die Antiangiogenese, die eine tumorinduzierte Neubildung von Blutgefäßen für die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen verhindert,

- die Therapie zur Korrektur des Tumorzellphenotyps, bei der mutierte Tumorsuppressorgene, wie z.B. p53 über adenovirale Transduktion, ersetzt oder Onkogene wie z.B. bcl-2 mittels antisense-Oligonukleotiden ausgeschaltet werden oder
- die Übertragung von onkolytischen Viren, die nach spezifischer Modifikation, z.B. durch Eliminierung von Genen oder durch organspezifische Regulation der Transkription, Tumorzellen befallen und diese lysieren.

Bisher ungelöste Probleme bei der Gentherapie sind die mangelnde Zellspezifität und unzureichende Gentransfer-Effizienzen. Kein etabliertes Gentransfersystem erreicht bisher die Tumorzellen mit hoher Spezifität. Eine Möglichkeit, um die unzureichende Spezifität zu erhöhen, ist die organspezifische Regulation der Transkription über die Verwendung leberspezifischer Genregulationselemente. Die Wahl des Promotors vor dem therapeutischen Gen scheint beispielsweise einen entscheidenden Einfluss auf die Zellspezifität und die Effektivität der Transgenexpression zu haben (Block et al. 1999, Wang et al. 2003). So konnte beispielsweise durch Verwendung des α -Fetoproteinpromotors bzw. -enhancers die Lebertumorspezifität deutlich erhöht werden (Kanai et al. 1997, Sakai et al. 2001, Cao et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die lokoregionale Applikation des therapeutischen Gens entweder über die *Arteria hepatica* (Anderson et al. 1998), wobei die primäre Versorgung des HCCs über die *A. hepatica* genutzt wird oder eine direkte intratumorale Injektion (Kuriyama et al. 1999). Zudem wird eine gezielte Behandlung von Leberzellen über spezifische Oberflächenrezeptoren angestrebt. So können z.B. Hepatozyten und eventuell sogar Hepatomzellen durch die Wechselwirkung des F-Hüllproteins des *Sendai-Virus* mit dem Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R), der ausschließlich in der Leber gebildet wird, spezifisch angesteuert werden.

1.2.1. Gentransfer-Systeme

Für den Gentransfer stehen verschiedene Transfersysteme zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihrer Gewebespezifität, der DNA-Aufnahmekapazität, der Immunogenität und in der Gentransfereffizienz unter-

scheiden. Ein idealer Vektor für alle gentherapeutischen Anwendungen konnte bisher nicht gefunden werden (Überblick in Verma & Somia 1997). Deshalb muss das Transfersystem in Abhängigkeit von der therapeutischen Zielsetzung ausgewählt werden. So ist z.B. im Falle eines toxischen Genproduktes nur eine kurzzeitige Expression des Transgens notwendig, für eine dauerhafte Expression zur Korrektur genetischer Krankheiten ist jedoch ein integrierender, nicht immunogener Vektor erforderlich, der eine langfristige Expression des therapeutischen Gens gewährleistet. Grundsätzlich unterteilt man in zwei Kategorien von Gentransfersystemen, in virale und nicht-virale Vektoren.

1.2.1.1. Virale Vektoren

Viren sind in der Lage, ihr genetisches Material effektiv in Fremdzellen zu übertragen. Für den Einsatz in der Gentherapie wurden verschiedene DNA- und RNA-Viren so verändert, dass sie ohne Fähigkeit zur Replikation insertierte DNA in Zellen übertragen können. Retroviren und Adenoviren werden bisher am häufigsten als rekombinante Genvektoren eingesetzt.

Grundlage für die Konstruktion retroviraler Vektoren ist das *Moloney Murine Leukemia-Virus* (MoMLV), ein Retrovirus, das Mäuse infiziert. Durch Pseudotypisierung (Einbau heterologer Hüllproteine) kann die Spezifität für bestimmte Zielzellen modifiziert und das Wirtsspektrum von Mäuse- und Rattenzellen auf humane Säugerzellen ausgedehnt werden. Für den gentherapeutische Einsatz wurden die Gene *gag*, *pol* und *env* entfernt, so dass therapeutische Transgene bis zu einer maximalen Größe von 8 kb eingefügt werden können. Durch Verwendung von Verpackungszelllinien, die neben den Sequenzen für die virale Replikation alle essentiellen Struktur- und Regulator-Proteine zur Verfügung stellen, erhält man rekombinante, replikationsdefiziente Viren in hohen Konzentrationen ohne Kontamination mit Wildtyp-Virus (Yang et al. 1999; Grignani et al. 1998; Danos & Mulligan 1988). Das übertragene genetische Material wird nach Transduktion mit retroviralen Vektoren stabil und effizient in die chromosomale DNA der Zielzelle eingebaut. Immunologische Probleme sind selten und nur im Zusammenhang mit der Bildung von Revertanten zu erwarten. Eine Wirtsimmunität gegen Retroviren kommt selten vor (Verma & Somia 1997).

Nachteilig erweist sich die oft ungerichtete Integration in das Genom der Zielzelle, bei der es zu einer Aktivierung von Onkogenen oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommen kann sowie die niedrige, retroviral-vermittelte Transduktionsrate von z.B. 0,2-2% einer normalen, tumorfreien Leber (Grossmann et al. 1994). Während sich die Anwendung MoMLV basierter retroviraler Systeme auf teilende Zellen beschränkt, ermöglichen lentivirale Vektoren auf der Basis des *Human Immunodeficiency-Virus* (HIV) den Gentransfer in ruhende, sich nicht aktiv teilende Zellen (Galley et al. 1995 & 1997).

Adenovirale Vektoren sind von den Adenoviren abgeleitete, replikationsdefiziente Viren, die über den ubiquitär vorkommenden Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (Bergelson et al. 1997) sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen effektiv transduzieren. Sie werden durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und verbleiben episomal im Zellkern. Die Expression der Fremdgene erfolgt transient, da es nicht zu einer Integration in die genomische DNA der Wirtszelle kommt. Schädigungen durch Tumorinduktion können so weitgehend ausgeschlossen werden. Um eine Propagation in der Wirtszelle und eine damit verbundene Zell-Lyse vollständig auszuschließen, sind die für die Virusreplikation und die Assemblierung notwendige E1A-E1B-Region des Adenovirus entfernt worden. Transgene bis zu einer Größe von 5,2 kb (bei zusätzlicher E3-Deletion steigt die DNA-Kapazität auf ca. 8 kb) werden als Expressionskassetten meist in die deletierte E1-Region eingefügt. Für die Erzeugung adenoviraler Vektoren müssen die in der E1A-E1B-Region enthaltenen Gene in *trans*, z.B. durch komplementierende Zellen zur Verfügung gestellt werden. Problematisch bei einem adenoviralen Gentransfer ist die bei hohen Dosen beobachtete inflammatorische Reaktion, die vermutlich durch eine *leaky* Expression adenoviraler Gene (Engelhardt et al. 1994) und das Antigen-Gedächtnis des Immunsystems ausgelöst wird. Das tragischste Beispiel dafür ist der Todesfall des 18-jährigen Jesse Gelsinger, der an dem seltenen Mangel des Enzyms Ornithin-Transcarbamoylase (OTC) in der Leber litt (Smith and Beyers 2002, Baker 2003). Er verstarb im September 1999 an Gerinnungsstörungen und Multiorganversagen, wenige Tage nachdem ihm Wissenschaftler der University of Pennsylvania 30 Milliarden replikationsdefiziente Adenoviren, in die das Gen für die OTC verpackt worden war, direkt in die *A. hepatica* injiziert hatten (Förstermann 2003). Seither werden sechs bis acht weitere Todesfälle mit gentherapeutischen Studien in Zusam-

menhang gebracht. Durch die Induktion von Immuntoleranz oder das Deletieren von Genen soll versucht werden, solche Immunreaktionen auszuschalten.

Erwähnt seien an dieser Stelle noch die nicht humanpathogen, adenoassoziierten Viren (AAV), die eine gerichtete Integration von Transgenen ins Wirtsgenom ermöglichen und sowohl teilungsaktive als auch ruhende Zelle infizieren. Eine Herstellung von rekombinanten AAV ist jedoch sehr aufwendig. Der aufgrund des kleinen Genoms nur begrenzt zur Verfügung stehende Raum für die Insertion eines Fremdgens stellt den entscheidenden Nachteil dieses Vektorsystems dar (Kotin 1994).

1.2.1.2. Nicht-viraler Gentransfer

Die meisten nicht-viralen Methoden des Gentransfers beruhen auf der rezeptorvermittelten Endozytose oder der Membranfusion mit Hilfe von Liposomen (Cotten & Wagner 1993). Bei der Aufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose wird die zu übertragende DNA mittels Polykationen wie Polylysin an einen Liganden gekoppelt, der dann von Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt wird. Kationische Lipide wie Lipofectamine™ oder DOTAP kondensieren die DNA mittels positiver Ladung und werden durch Membranfusion in die Zellen aufgenommen. Als mechanische Verfahren des Gentransfers sind die Elektroporation (Heller et al. 2000) und die Mikroinjektion (Davis et al. 2000) zu nennen. Hauptnachteile nicht-viraler Gentransfer-Systeme sind die geringe *in vivo*-Transfektionseffizienz.

1.3. Suizidgentherapie

Das Wirkungsprinzip der Suizidgentherapie (Abb. 1) basiert auf der Einschleusung von körperfremden „Selbstmordgenen“ in das Zielorgan, wo sie nach Expression und Proteinbiosynthese systemisch verabreichte nichttoxische Substrate (sog. *prodrugs*) in hochtoxische Wirkstoffe umsetzen oder deren Umsetzung katalysieren, welche die transduzierte Tumorzelle in den „Suizid“ führen (Lal et al. 2000, Lauer et al. 1998, Moolten 1994).

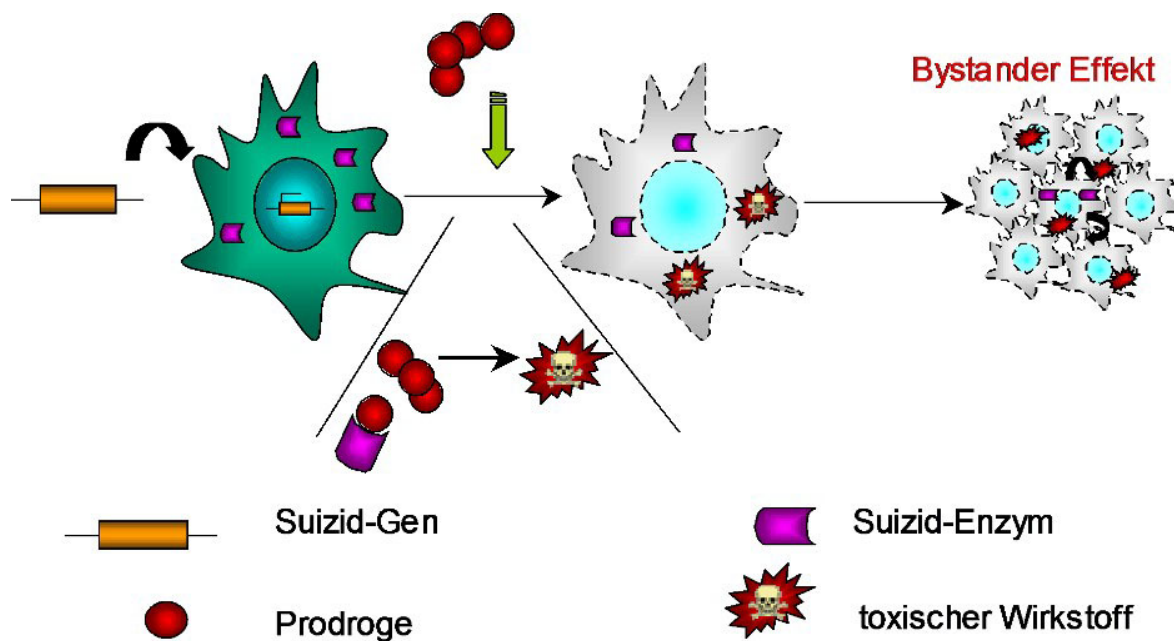


Abb. 1: Wirkungsweise der Suizidgentherapie in Tumorzellen

Nach dem Gentransfer in die Tumorzelle wird das Suizid-Gen exprimiert. Das entstehende Enzym katalysiert die Umsetzung eines applizierten, nicht toxischen Medikaments in ein hochwirksames Zytostatikum, welches mittels *bystander effect* in die umliegenden Tumorzellen diffundiert und diese wie auch die transduzierte Zelle abtötet.

Entscheidend für die antitumorale Wirkung des Suizidgenes im Zielorgan ist die Transduktionsrate, die Dauer und Höhe der Genexpression und die Menge an gebildetem toxischen Wirkstoff. Die mit den z.Z. verfügbaren Gentransfersystemen erreichten geringen Transduktionsraten von maximal 10% können durch den sog. *bystander effect* zum Teil kompensiert werden. Darunter versteht man den interzellulären Transport der gebildeten toxischen Substanz, ausgehend von den primär produzierenden Zellen, über einfache Diffusion oder über Zell-Zellkommunikation (*gap junction*) in die umliegenden, nicht-produzierenden Zellen, wo sie ebenfalls wirksam werden kann (Domin et al. 1993). Während bei der zielgerichteten Suizidgentherapie, lokal im Bereich des erfolgten Gentransfers begrenzt, sehr hohe Konzentrationen an toxischem Wirkstoff erzeugt werden, kann die systemische Toxizität, wie sie unter einer konventionellen Chemotherapie auftritt, stark reduziert werden. Die bislang am erfolgreichsten untersuchten Suizidgene sind die Cytosin Desaminase (bCD) aus *Escherichia coli* (EC 3.5.4.1), welche die Umsetzung von nichttoxischem 5-Fluorcytosin (5FC) zu cytotoxischem 5-Fluoruracil (5FU) katalysiert und die Thymidin-Kinase (TK) aus

Herpes simplex -Virus Typ -1 (HSV-1), die das Guanosin-Analogon Ganciclovir (GCV) spezifisch phosphoryliert, welches dann in der Triphosphat-Stufe inhibierend auf die Elongation der DNA-Synthese wirkt (McKnight 1980). Vorläufige Vergleiche der beiden Suizidgen-Strategien ergaben, dass das bCD/5-FC-System sowohl in Zellkultur (Hoganson et al. 1996, Kuriyama et al. 1999) als auch bei implantierten Tumoren (Trinh et al. 1995) effektiver als das TK/GCV-System wirkt.

1.4. Cytosin Desaminase aus *E.coli* und ihre suizidgentherapeutische Wirkung

Das Cytosin Desaminase (CD)-Gen kommt in einer Vielzahl von Bakterien, Hefen und Pilzen vor, wird jedoch nicht in Säugetieren gefunden (Andersen et al. 1989). Strukturelle Untersuchungen ergaben (Ireton et al. 2002), dass die bakterielle Cytosin Desaminase aus *Escherichia coli* (bCD) in ihrer natürlichen Umgebung dimersiert und sich dann zu einem Hexamer zusammenlagert.

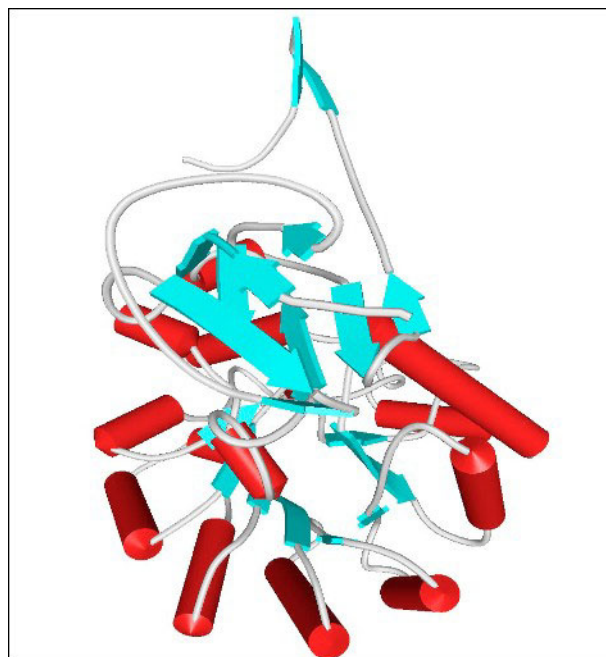


Abb. 2: Quartärstruktur der Cytosin Desaminase (Monomer) aus *E. coli*
(Ireton et al. 2002)

Die bCD ist ein Metalloenzym, das auf Grund seiner spezifischen enzymatischen Funktion die Umwandlung des in die Zelle diffundierten 5FC, welches in der üblichen, z.B. zur Pilzbekämpfung, verwandten Dosis für den Menschen weitgehend ungefährlich ist, zu 5FU (Abb. 3) katalysiert.

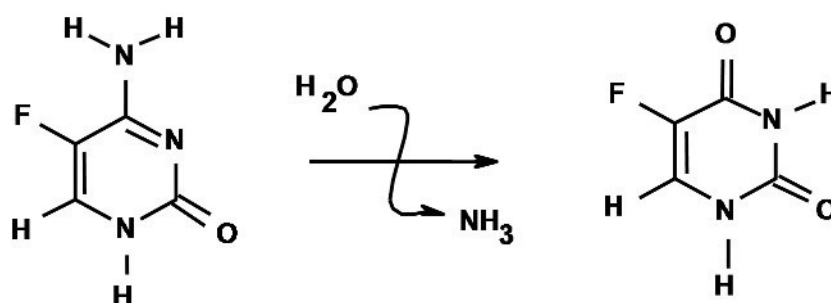


Abb. 3: Desaminierung von 5-Fluorcytosin zu 5-Fluoruracil und Ammoniak

Um die Desaminierung katalysieren zu können, muss die Cytosin Desaminase als Holoenzym vorliegen, welches aus dem inaktiven Apoenzym und einem katalytisch essentiellen divalenten Metallion, bevorzugt zweiwertigem Eisen oder Zink, gebildet wird (Porter et al. 1993 & 2000). Eine Entfernung des Metallions aus dem mittig in der Proteinstruktur gelegenen aktiven Zentrum des Enzyms, z.B. durch *o*-Phenanthrolin oder EDTA, führt zu einer reversiblen Inaktivierung, die durch Zuführung von Fe^{2+} in Form von FeSO_4 wieder aufgehoben werden kann (Ireton et al. 2002). Das bei der Desaminierung gebildete 5FU, ein Analogon der Pyrimidinbase Uracil und als hochwirksames Chemotherapeutikum bekannt, wird von intrazellulären Enzymen aus dem wirtseigenen Nukleotidstoffwechsel durch die Addition von Ribose und Desoxyribose in seine aktive Nukleosidform umgewandelt. Im weiteren Reaktionsverlauf entstehen drei aktive Metabolite: Fluoruridintriphosphat (FUTP), Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und Fluor-desoxyuridintriphosphat (FdUTP). Diese aktiven Metabolite stören nicht nur den endogenen Nukleotidstoffwechsel der Zielzelle (Abb. 4) sondern inhibieren auch die RNA-Synthese und führen zum Abbruch der DNA-Synthese während der S-Phase des Zellzyklus (Corban-Wilhelm et al. 2004, Brown and Lemoine, 2004).

2003). Die Enzyminhibition hat eine Reduzierung von Thymidin zur Folge, welches für die DNA-Synthese benötigt wird. Enzyminhibitoren, wie das FdUMP, die ein Enzym nach dem Durchlaufen einiger Schritte seiner regulären Reaktionskaskade inaktivieren, bezeichnet man daher auch als Suizid-Substrate.

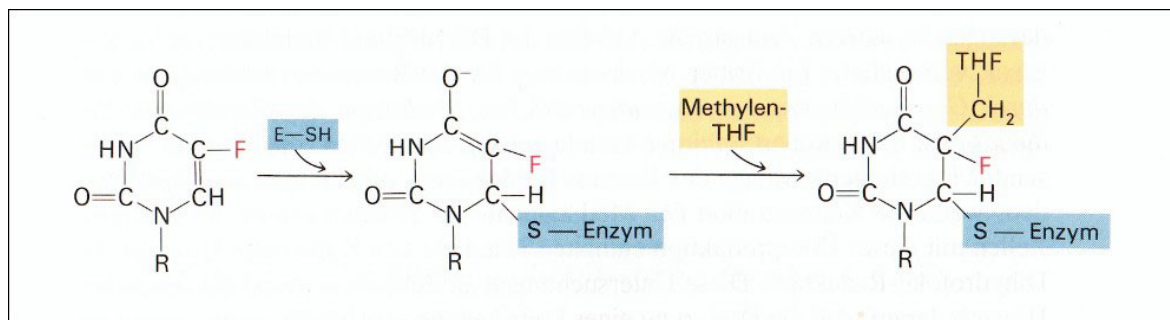


Abb. 5: Irreversible Hemmung des Enzyms Thymidilat-Synthase (TS) durch FdUMP (Stryer 2002)

Bildung eines dauerhaften ternären Substrat-Enzym-Methyldonor (Tetrahydrofolat-THF)-Komplex, da das Enzym Fluor, als elektronegativstes Element, nicht als Proton vom C(5) abziehen kann

Durch den Mangel an dTTP kommt es zum Einbau von FdUTP bzw. UTP in die DNA, die zum Abbruch der DNA-Replikation und damit zu einer Hemmung der Zellproliferation in schnell wachsenden Tumorzellen führen, da diese auf eine ständige Versorgung mit Desoxyribonukleotiden für die DNA-Neusynthese angewiesen sind. In den Tumorzellen entsteht, bedingt durch dauerhaften Mangel an Thymidilat und Thymin ein Arrest in der Synthesephase des Zellzyklus und die Tumorzelle wird als Folge einer Fas/FasL vermittelten Apoptose (Houghton et al. 1997) zugeführt, die auch als sog. *thymine less death* bezeichnet wird. In präklinischen Studien konnte an Tiermodellen gezeigt werden, dass die Metabolisierung von 5FC durch die Cytosin Desaminase eine Hemmung des Tumorstwachstums bewirken kann (Uckert et al. 1998; Topf et al. 1998; Ge et al. 1997; Kanai et al. 1997; Ohwada et al. 1996; Trinh et al. 1995; Consalvo et al. 1995; Richards et al. 1995; Mullen et al. 1994; Huber et al. 1994; Huber et al. 1993). Zur Erzielung eines signifikanten Antitumoreffektes reicht unter optimalen Bedingungen bereits eine bCD-Gentransfer-Effizienz von 5% aus, was sich durch die Menge an 5FU, die in bCD-positiven Zellen produziert wird, erklären lässt

und die über den *bystander effect* in benachbarte, nicht-transduzierte Tumorzellen gelangen, um dort wirksam zu werden (Uckert et al. 1998; Dong et al. 1996; Hirschowitz et al. 1995; Huber et al. 1994).

1.5. Interzellulärer Transport mit zellpermeablen Peptiden

In den letzten Jahren wurden verschiedene zellpermeable Peptide und Proteine beschrieben, die ohne Signalsequenzen, abweichend von der klassischen Aufnahme, in die Zelle bzw. einer vom Endoplasmatischen Retikulum und vom Golgi Apparat abhängigen Sekretion einen interzellulären Transport von Peptiden, Proteinen, Polyamid Nukleotid Analoga (PNA) sowie DNA- und RNA-Fragmente zur Antisense-Therapie und DNA ermöglichen (Morris et al. 2000). Beispiele für derartige Peptide sind

- die Homöo-Domäne der Homöoboxproteine von *Antennapedia*, einem alpha-helikalen, amphiphilen Transkriptionsfaktor aus *Drosophila melanogaster* und die daraus abgeleiteten Penetratine (Derossi et al. 1994 und 1998), die energie- und rezeptorunabhängig nach Dimerisierung über ihre basischen, positiv geladenen Reste mit den negativ geladenen Phospholipiden interagieren (Console et al. 2003) und eine Freisetzung in die Zelle über invertierende Mizellen ermöglichen
- das hierzu strukturverwandte, aus der Islet-1 Homöo-Domäne abgeleitete Peptid pIS1 (Magzoub 2001, Kilk et al. 2001)
- das aus dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) stammende, kationische, hydrophile TAT-Protein (Vives 2003), ein 87 Aminosäure (aa) großer Transaktivator, der vermutlich über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Silhou et al. 2002, Console et al. 2003, Vives et al. 2003)
- die aus dem Herpes Simplex Virus (HSV) und dem Marek's Disease Virus stammenden homologen Proteine HSV-1 VP-22 und MDV-1 VP-22 (Elliott et al. 1997 and Dorange et al. 2000), welche aus der synthetisierenden Zelle Golgi-unabhängig sekretiert und anschließend rezeptorunabhängig von den benachbarten Zellen aufgenommen werden

- der hydrophobe Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (K-FGF) (Rojas et al. 1998), die golgiunabhängig (Jackson et al. 1992) sekretiert und anschließend mittels rezeptorvermittelter Endozytose wieder aufgenommen werden
- das 27 aa große, kationische, stark hydrophobe Transportan (Pooga et al. 1998), ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Bereich des Galanins und des C-terminalen Bereich des Mastoparans, für das eine Aufnahme über invertierende Mizellen diskutiert wird sowie
- das Hepatitis B-Virus-Translokationsmotiv.

1.5.1.1. Das Hepatitis B-Virus-Translokationsmotiv (HBV-TLM)

Aus der PräS2-Region der Oberflächenproteine des Hepatitis B-Virus wurde im Bereich zwischen Aminosäure 41 und 52 (PLSSIFSRIGDP, Subtyp ayw) ein 12 Aminosäure umfassendes alpha-helikales Peptid-Motiv, das sog. *translocation motif* (Hildt et al. 1995, Oess 2000), charakterisiert, für das die Eigenschaft der Zellpermeabilität nachgewiesen werden konnte. Als amphiphile alpha-Helix (Abb. 6), die Grundlage für eine strenge Struktur-Funktionsbeziehung ist, kann das HBV-TLM zu einem energie- und rezeptorunabhängigen Transport von Peptiden (Oess et al. 2000), zum Transport von funktionellen Proteinen (Brandenburg 2001, Haffner et al. 2003), zum Transport von Partikeln (Stöckl et al. 2002) sowie zum Transport von Nukleinsäuren (Stöckl et al. 1999) eingesetzt werden.

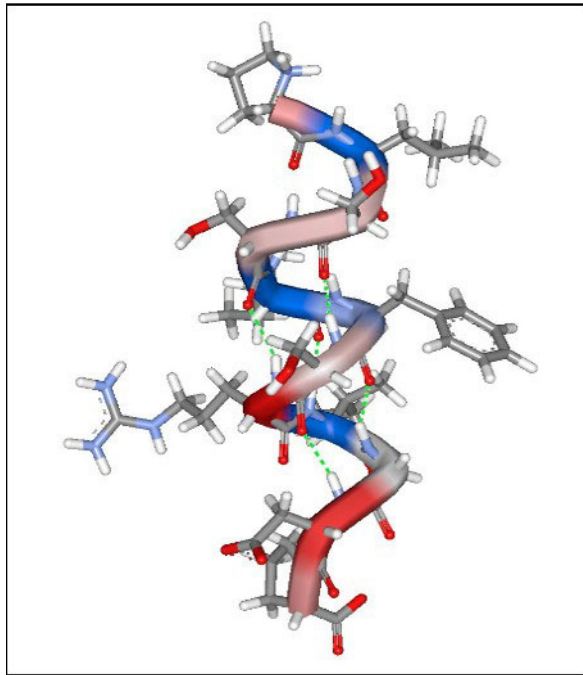


Abb. 6: **Strukturmodell des HBV-TLM**
(erstellt mittels *molecular modeling*)

Mutationen in der Aminosäuresequenz können zu einer Umlagerung der amphiphilen Alpha-Helix zu einer β -Faltblatt-Struktur führen, wodurch die Eigenschaft der Zellpermeabilität verloren geht. Eine Spezifität für bestimmte subzelluläre Strukturen konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

2. Zielsetzung

Die Wirksamkeit von suizidgentherapeutischen Ansätzen wird vor allem durch die derzeit erreichten primären Transduktionsraten der verfügbaren Gentransfersysteme eingeschränkt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die begrenzte Wirksamkeit durch die Generierung von Suizidproteinen, die sich interzellulär ausbreiten können, zu erhöhen. Um die angestrebte Verstärkung des *bystander* Effektes durch die interzelluläre Ausbreitung der Effektorproteine zu erreichen, sollten die Transporteigenschaften eines neuartigen zellpermeablen Peptids (HBV-*TLM*) genutzt werden.

Dazu sollten prokaryontische Fusionskonstrukte, bestehend aus dem HBV-*TLM* der PräS2-Region des Hepatitis B Virus und der bakteriellen Cytosin Desaminase generiert und die synthetisierten Fusionsproteine aus dem bakteriellen Produktionssystem gereinigt werden.

Die proteinchemische Charakterisierung der Fusionsproteine erforderte die Erzeugung polyklonaler Antiseren und die Reinigung proteinspezifischer Antikörper.

Die gereinigten prokaryontischen Fusionsproteine sollten hinsichtlich der strukturellen Voraussetzungen für eine katalytische Aktivität charakterisiert und ihre Funktionalität als Grundvoraussetzung für den Einsatz in der Suizidgentherapie nachgewiesen werden. Zu klären war die Frage, ob die Fusion des HBV-*TLM* zu einer Beeinflussung der Funktionalität des Enzyms Cytosin Desaminase führt.

Von entscheidender Bedeutung war außerdem, ob die Fusion des HBV-*TLM* an das bakterielle Suizidprotein Cytosin Desaminase zu einer nachweisbaren Zellpermeabilität der prokaryontischen Fusionsproteine führt und ob Unterschiede in der Transfereffizienz in Abhängigkeit von dem Ort der Fusion (C- bzw. N-terminal) festgestellt werden können.

Des Weiteren sollten eukaryontische Fusionskonstrukte hergestellt und die nach Transfektion der Expressionsplasmide in Tumorzellen synthetisierten Proteine auf ihre Funktionalität und Zellpermeabilität untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Die Chemikalien, Salze und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders erwähnt, in der Qualität „reinst“ oder „analytic grade“ von den Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Merck, Serva, und Difco bezogen. Der Begriff H_2O_{dd} wird im Folgenden für bidestilliertes Wasser verwendet, das über eine Milli-Q-Filteranlage (Millipore) gereinigt wurde. Als „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen oder Materialien wurden für 20 min bei 120 °C und 2 bar autoklaviert. Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden über eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,22 µm, Sartorius) filtriert.

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Agar	Gibco, USA
Agarose	Promega, Mannheim
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Gibco, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA
Butanol (-1)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Capronsäure	Sigma, Deisenhofen
Chloroform (Trichlormethan)	Roth, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau G 250	Sigma, Deisenhofen
Cytosin	Sigma, Deisenhofen
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Didesoxynukleotide (dNTP)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Deisenhofen

Dinatriumcarbonat	Sigma, Deisenhofen
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
ECL-Western Blot Detektionssystem	AP Biotech, Schweden
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Filterpapier 3MM	Whatman
5-Fluorcytosin	Sigma, Deisenhofen
5-Fluoruracil	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Sigma, Deisenhofen
Freunds Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Fluka, Deisenhofen
Glutaraldehyd 25%	Fluka, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	ICN
Hefeextrakt	Gibco, USA
Hybond- P PVDF-Membran	AP Biotech, Schweden
Imidazol	Fluka, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Kaliumacetat	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen
Leupeptin	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
β - Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Fluka, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe

Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Saponin #S-2149	Sigma, Deisenhofen
Silbernitrat	Fluka, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-tetramethylaminomethan (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	ICN
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen
Tween 20	Fluka, Deisenhofen
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckman, USA
Uracil	Sigma, Deisenhofen

3.1.2. Enzyme

Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
DNase I, RNasefrei	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen Typ II	Roche, Mannheim
RNase A	Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Bioline, Deutschland

3.1.3. Blotmembranen / Filme

Hybond PVDF	AP Biotech, Schweden
Hybond ECL	AP Biotech, Schweden
Hyperfilm ECL	AP Biotech, Schweden

3.1.4. Antikörper

Primäre Antikörper:

Actin (I-19): sc-1616 (from goat)	Santa Cruz Biotechnology
-----------------------------------	--------------------------

Sekundäre Antikörper:

anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey): NA934V	AP Biotech, Schweden
--	----------------------

anti-sheep/goat Ig, biotinylated whole antibody (from donkey): RPN 1025	AP Biotech, Schweden
---	----------------------

Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate RPN 1231	AP Biotech, Schweden
--	----------------------

Cy TM 3-conjugated AffiniPure anti-rabbit IgG c=1mg/ml	Jackson Immuno Research Laboratories, USA
---	---

Phalloidin-FITC	Sigma, Deisenhofen
-----------------	--------------------

3.1.5. Materialien für die Zellkultur

DMEM	Gibco, USA
------	------------

(*Dulbecco's Modified Eagles Medium*)

FCS Gold (fötales Kälberserum)	PAA
--------------------------------	-----

Natriumpyruvat	PAA
----------------	-----

Trypsin-EDTA-Lösung	PAA
---------------------	-----

L-Glutamin (200 mM)	PAA
---------------------	-----

Penizillin-Streptomycin-Lösung	PAA
--------------------------------	-----

Geneticin	PAA
-----------	-----

Lipofectamin	Invitrogen, USA
--------------	-----------------

DOTAP	Roth, Karlsruhe
-------	-----------------

Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
------------	--------------------

3.1.6. Längenstandards

low molecular weight marker

AP Biotech, Schweden

(LMW)-Marker

Rainbow Marker RPN 756

AP Biotech, Schweden

DNA Längenstandard X

Roche, Boehringer, Mannheim

peqGold 1kb DNA Leiter

peqLab, Erlangen

3.1.7. Verwendete Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen, Hilden

QIAprep Maxiprep Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

ECL 1 & 2 Substrat

AP Biotech, Schweden

AmpliTaQ® FS BigDyeTerminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

PE Biosystems

Bio-Rad Protein Assay

BIO-RAD Laboratories GmbH,
München

3.1.8. Plasmide

pcDNA3

Invitrogen, USA



Genereller Klonierungs-Vektor für die Expression in Säugerzellen (Invitrogen).

Wichtige Komponenten:

- **hCMV-Promotor:** „*immediate early*“-Promotor des humanen Cytomegalie-Virus (hCMV)
- multiple Klonierungs-Stelle (**MCS:** multiple cloning site) mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens

- Polyadenylierungs-Signal des Rinder-Wachstums-Hormons (*bovine growth hormone*, **BGH-pA**)
- **SV40-Enhancer/Promotor**: gekoppeltes Enhancer/Promotor-Fragment aus Simian Virus 40
- Neomycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransferase des Transposons Tn5; **Neo^r**): dient als Selektionsmarker; vermittelt Resistenz gegen Neomycin und G418 (Geneticin)
- Polyadenylierungs-Signal aus Simian Virus 40 (**SV40-pA**)
- bakterielle pUC19-Sequenzen: enthalten ORI (nicht gezeigt) und Ampicillin-Resistenz-Gen (**Amp^r**).

pQe60 und pQe8, pREP4

Die pQe-Vektoren gehören zur Familie der pDS-Plasmide (Bujard et al. 1987) und wurden zur Klonierung von PCR-Fragmenten herangezogen. Die Expression des Transgens erfolgt bei beiden prokaryontischen Klonierungsvektoren unter der Kontrolle des stromabwärts gelegenen T5-Promotors des Phagen T5 und zwei *lac* Operator-Sequenzen, die eine verstärkte Bindung des *lac*-Repressors und damit eine effiziente Repression des starken T5 Promotors gewährleisten. Eine synthetische ribosomale Bindungsstelle (RBSII) sorgt für hohe Translationsraten. Für die Replikation des Plasmides steht das ColE1 Origin zur Verfügung. Der pQe60-Klonierungsvektor fügt carboxyterminal und der pQe8-Vektor aminoterminal ein 6xHis-Tag an das insertierte Gen an. Die Genexpression, insbesondere beim Plasmid pQe60, ist aufgrund der optimierten Promotor/Operator-Region sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher *lac*-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Die von der *E.coli*-Wirtszelle bereit gestellte Menge reicht hierfür nicht aus, so dass ein zweites Plasmid, pREP4, benötigt wird, um eine kontrollierte Expression der His-tag-Fusionen zu gewährleisten. Dieses Plasmid trägt das den *lac*Repressor-kodierende *lacI*-Gen (Farabough, 1978) sowie das *neo*-Gen, dessen Produkt eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Aufgrund einer Mutation in der RBS produziert pREP4 weniger Neo, so dass 25 µg/ml Kanamycin zur Selektion Plasmid tragender Zellen ausreichen.

3.1.9. Oligonukleotide

Primer zur Amplifikation prokaryontischer Fusionskonstrukte

Die Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung wurden von der Firma TIB-Molbiol (Berlin) hergestellt.

HBV-TLM-Cytosin Desaminase

fw BHI TLM Cd 5'-CCC ggA TCC ATg CCC TTA TCg TCA ATC TTC TCg Agg
 ATT ggg gAC CCT ATg TCg AAT AAC gCT TTA CAA ACA
 bwBHICDase2 5'-CCC ggA TCC ACg TTT gTA ATC gAT ggC TCC

Cytosin Desaminase-HBV-TLM

fwBHI Cdase 5'-CCC ggA TCC ATG TCG AAT AAC gCT TTA CAA
 bwBHITLMcd2 5'-CCC ggA TCC Agg gTC CCC AAT CCT CgA gAA gAT
 TgA CgA TAA ggg ACg TTT gTA ATC gAT ggC TTC

Cytosin Desaminase

fw BHI Cdase 5'-CCC ggA TCC ATG TCG AAT AAC gCT TTA CAA
 bwBHICDase2 5'-CCC ggA TCC ACg TTT gTA ATC gAT ggC TCC

Primer zur Amplifikation eukaryontischer Fusionskonstrukte

6His-Cytosin Desaminase

fwBHI6HisCD1 5'-CCC ggA TCC ATg CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATg
 TCg AAT AAC gCT TTA CAA
 bwBHICdase1 5'-CCC ggA TCC TCA ACg TTT gTA ATC gAT ggC TTC

6His-Cytosin Desaminase-HBV-TLM

fwBHI6HisCD1 5'-CCC ggA TCC ATg CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATg
 TCg AAT AAC gCT TTA CAA
 bwBHITLMcd1 5'-CCC ggA TCC TCA Agg gTC CCC AAT CCT CgA gAA
 gAT TgA CgA TAA ggg ACg TTT gTA ATC gAT ggC TTC

HBV-TLM-Cytosin Desaminase-6His

fw BHI TLM Cd 5'-CCC ggA TCC ATg CCC TTA TCg TCA ATC TTC TCg Agg
 ATT ggg gAC CCT ATg TCg AAT AAC gCT TTA CAA ACA
 bwBHI6Hiscd1 5'-CCC ggA TCC TCA gTg ATg gTg ATg gTg ATg ACg TTT
 gTA ATC gAT ggC TTC

Primer für die Sequenzanalyse**Cytosin Desaminase**

seqCDase-1 5'-gAA CTg gAA TCA gTC
 seqCDase-2 5'-TgT TCg ATA CgT ATC C
 fw-seq-cdase 5'-CCA ACg gTg AAg Cg
 seqbwCD200 5'-gTg TCC Agg TgA ATA Tg
 seq-bwCD700 5'-ggT AAA TTC AAA ATg Cg

pQe-Vektoren

seqfwpQe 5'-Cgg ATA ACA ATT TCA CAC Ag
 seqbwpQe 5'-gTT CTg Agg TCA TTA CTg g

pcDNA-Vektoren

seqbwpcDNA 5'-Tag AAg gCA CAg TCg Agg
 seqfwpcDNA 5'-TAA TAC gAC TCA CTA TAg

Primer für die Mycoplasmen-PCR

fwmyco 5'-CgC CTg AgT AgT ACg TTC gC
 revmyco 5'-gCg gTg TgT ACA AgA CCC gA

3.1.10. Zelllinien und Bakterienstämme

Die verwendeten Zelllinien wurden von der DSMZ bezogen.

Eukaryontische Zelllinien

HepG2 Zelllinie eines humanen Hepatozellulären Karzinoms ACC 180

huH 7 Zelllinie eines humanen Hepatozellulären Karzinoms [Nakabayashi et al. 1982]

Bakterienstämme

E. coli K12 DH5α *F*⁻, *endA1*, *hsdR17* (*rk*⁻, *mk*⁺), *supE44*, *thi1*, *lambda*⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *Ø80dlacZ M15* (Gibco/BRL)

E. coli K12 SG13009 *Nal*^S, *Str*^S, *Rif*^S, *Thi*⁻, *Lac*⁻, *Ara*⁺, *Gal*⁺, *Mtl*⁻, *F*⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺(Qiagen)

3.1.11. Geräte

Elektrophorese- und Blotsysteme

Horizontal-Elektrophorese-Systeme GNA 100 und 200	AP Biotech, Schweden
Stromgeber EPS 301	Hoefer, Schweden
Vertikale-Elektrophorese-Systeme SE 260 und 600	AP Biotech, Schweden
Semi-Dry-Blotkammer Semiphor	AP Biotech, Schweden

Zentrifugen / Rotoren

Tischzentrifugen Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Untertischzentrifuge Minifuge 2	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Superspeed RC-5B	Sorvall-Instruments,
Bad Homburg	
Rotoren: HB 4, GS 3, SS34	Sorvall-Instruments,
Bad Homburg	
Ultrazentrifuge L8 mit Ti 60 Rotor	Beckman, USA

Chromatographie

Äkta Explorer	AP Biotech, Schweden
Äkta Purifier	AP Biotech, Schweden
Ettan LC	AP Biotech, Schweden

Gelfiltrationssäulen

Superose 6 PC 3.2/30	AP Biotech, Schweden
----------------------	----------------------

Affinitätschromatographiesäulen

Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden
NHS activated Sepharose 4 Fast Flow	AP Biotech, Schweden

Reversed phase-Säulen

C18 Eurospher	Knauer, Berlin
---------------	----------------

Mikroskope

Lichtmikroskop Diavert	Leitz, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM RBE	Leitz, Deutschland
Konfokales Laserscan Mikroskop LSM 510	Zeiss, Deutschland

Sonstige Geräte

FACS Calibur	Beckton-Dickinson, San Jose, U
Thermo-Cycler PTC-100	MJ Research, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Unitron HT-Infors	Bottmingen, Schweiz
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Universalwaage	Sartorius Göttingen
Feinwaage 1608 MP	Sartorius, Göttingen
Photometer Ultraspec 3300 pro	AP Biotech, Schweden
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode
Tischschüttler Duomax 1030	Heidolph
Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Filmentwickler Agfa Curix 60	Agfa, Köln
1,5 l Fermenter	New Brunswick Bioscience
Elisa-Reader Delta sunrise	Tecan

3.1.12. Puffer und Lösungen

- **Ampicillin-Stammlösung**
100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **Aprotinin-Stammlösung**
1 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **Cytosin-Stammlösung**
10 mM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **EDTA-Stammlösung, pH 8,0**
0,5 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, Lagerung bei RT
- **5-Fluorcytosin-Stammlösung**
10 mM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte dunkle Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **5-Fluoruracil-Stammlösung**
10 mM in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte dunkle Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **Genitacin-Stammlösung**
700 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- **IPTG-Stammlösung**
1 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

- **Kanamycin-Stammlösung**

25 mg/ml in H₂O_{dd}

sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei -20 °C

- **Leupeptin-Stammlösung**

1 mg/ml in H₂O_{dd}

sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei -20 °C

- **LB-Medium**

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

autoklaviert, Lagerung bei 4°C

- **LB-Agarplatten**

LB-Medium

15 g/l Agar

Lagerung bei 4°C

- **Natriumacetat-Stammlösung**

2 M in H₂O_{dd}

pH 6,0

sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

- **Phalloidin-FITC-Stammlösung**

0,1 mg/ml in DMSO

aliquotierte Lagerung bei -20 °C

- **PBS-Puffer** -phosphate buffered saline- (**10fach**)

400 g NaCl

10 g Kaliumchlorid

57,5 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2H₂O

10 g Kaliumdihydrogenphosphat

ad. 5.000 ml H₂O_{dd}

sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C

- **PMSF-Stammlösung**

0,1 M in Ethanol

aliquotierte Lagerung bei -20 °C

- **Proteinase K-Stammlösung**

10 mg/ml Proteinase K

50 mM Tris-Cl, pH 8,0

1 mM Kalziumchlorid

sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei 4 °C

- **SDS-Stammlösung**

20% in Wasser

Lagerung bei RT

- **TE-Puffer**

0,01 M Tris-Cl, pH 7,4

1 mM EDTA, pH 8,0

- **Uracil-Stammlösung**

10 mM in H₂O_{dd}

sterilfiltriert, aliquotierte Lagerung bei -20 °C

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht gesondert erwähnt, wurden die folgenden Methoden in Anlehnung an „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, Sambrook et al. 1989, durchgeführt.

3.2.1.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine effiziente Methode, um ein spezifisches DNA-Segment selektiv zu amplifizieren. Eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase), isoliert aus *Thermus aquaticus*, katalysiert nach dem Denaturierungs-Schritt und dem Hybridisieren der Primer an die DNA-Matrize (Annealing) die Verlängerung der Primer (Elongation). Durch die zyklische Anwendung von Denaturierung, Annealing und Elongation gelingt die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Alle PCR-Reaktionen, die nicht einer Klonierung dienen, wurden mit herkömmlicher Taq-Polymerase angesetzt. Für präparative Amplifikationen zum Zweck einer Klonierung wurde Advantage 2 Polymerase Mix verwendet. Neben einer nukleasedefizienten, N-terminal deletierten Taq-Polymerase enthält dieser Mix eine *proofreading* Polymerase, die mit ihrer 3' → 5'-Exonuclease-Aktivität fehlgepaarte Basen wieder entfernt und einen spezifischen Polymerase-Antikörper, der die Polymerase inaktiviert und erst bei hohen Temperaturen denaturiert und die Polymerase freigibt.

Komponente		Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
Reaktions- ansatz	10x PCR Puffer	10 µl	1x
	100 mM dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	0,8 µl	800 µM (je 200 µM)
	100 µM Vorwärts-Primer	0,5 µl	0,5 µM
	100 µM Rückwärts-Primer	0,5 µl	0,5 µM
	H ₂ O _{dd}	87,7 -x µl oder 86,2-x µl	
	Taq-DNA-Polymerase oder 50xAdvantage 2 Polymerase Mix	0,5 µl 2 µl	2,5 U 1x
	DNA	Plasmid oder genomische DNA	x
Endvolumen			100 µl

Programmschritt		Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung		1 min	94 °C
3-Schritt PCR 25 Zyklen	Denaturieren	30 s	94 °C
	Annealing	30 s	54-70 °C
	Elongation	1 min	72 °C
Finale Elongation		10 min	72 °C

3.2.1.2. Colony-PCR zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone

Die *Colony*-PCR diente als Alternative zur klassischen Charakterisierung von transformierten Bakterien durch eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA mit anschließender Restriktionsanalyse. Sollte nur das Vorhandensein eines insertierten DNA-Fragmentes nachgewiesen werden, wurden die Primer so gewählt, dass sie stromaufwärts und stromabwärts der verwendeten Klonierungsstelle an den Vektor hybridisierten. Konnte bei der Klonierung das Insert in zwei Orientierung-

gen eingefügt werden, wurde durch Auswahl eines dritten Oligonukleotidprimers, der asymmetrisch im Insert hybridisiert, zusätzlich die Insertionsrichtung festgestellt. Die der Subklonierung zugrunde liegende Vektor-DNA wurde bei der *Colony*-PCR als Positivkontrolle verwendet. Die Bakterienklone wurden dabei zunächst auf nummerierte LB-Platten überführt und mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in die PCR-Reaktion (25 µl) eingebracht. Eine initiale Denaturierung für 60 sec bei 94 °C war ausreichend, um die Bakterienzellwand zu denaturieren, so dass die Plasmid-DNA als Matrize freigesetzt wurden.

Komponente		Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
Reaktionsansatz	10x PCR Puffer	25 µl	1x
für 10 Ansätze	100 mM dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	2 µl	800 µM (je 200 µM)
	100 µM Vorwärts-Primer	1,25 µl	0,5 µM
	100 µM Rückwärts-Primer	1,25 µl	0,5 µM
	H ₂ O _{dd}	219,25 µl	
	Taq-DNA-Polymerase	1,25 µl	2,5 U
Endvolumen			250 µl

Programmschritt		Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung		1 min	94 °C
3-Schritt PCR	Denaturieren	30 s	94 °C
25 Zyklen	Annealing	30 s	54-70 °C
	Elongation	1 min	72 °C
Finale Elongation		10 min	72 °C

Ein Aliquot jeder Reaktion wurde nachfolgend auf ein analytisches Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.1.3. Native Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Aufgrund des negativ geladenen Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Molekülgröße und Dichte des Gels. DNA-Fragmenten im Größenbereich von 0,1–10 kb wurden für analytische und präparative Zwecke in horizontalen 1-1,5%igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die elektrophoretische Trennung wurde 1-1,5% Agarose mit 1x TAE-Puffer im Mikrowellenofen kurz aufgeköcht, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid-Stammlösung (Endkonzentration 0,2 µg/ml) versetzt und das Gel in einen abgeklebten Gelschlitten mit entsprechendem Kamm gegossen. Die DNA-Proben (0,1-0,5 µg DNA) wurden mit einem Fünftel 5x DNA-Ladepuffer versetzt, mit H₂O_{dd} auf 10 µl aufgefüllt und mit einem DNA-Längenstandard in die Taschen des polymerisierten Gels pipettiert. Die Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Flachbett-Elektrophorese-Kammer bei konstanter Spannung (2-10 V/cm) für ca. 60 min. Die Photodokumentation wurde nach Fluoreszenz-Anregung der gefärbten DNA mit langwelligem UV-Licht durchgeführt.

- **TAE-Puffer**

- 40 mM Tris-Cl, pH 8,0
 - 40 mM Natriumacetat
 - 1 mM EDTA

- **5x DNA-Ladepuffer**

- 10 mM Tris-Cl
 - 100 mM NaCl
 - 0,25% Bromphenolblau
 - 30% Glycerol

3.2.1.4. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die enzymatische DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer modifizierten Form der Strangabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger et al. 1975), wobei die zu sequenzierende DNA in einer Synthesereaktion vervielfältigt wird.

Anstelle von radioaktiv markierten Didesoxynukleotiden wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide verwendet. Wird ein solches modifiziertes Nukleotid in die neue DNA-Sequenz eingebaut, kommt es zu einem Strangabbruch, da das Anfügen des nächsten Nukleotides verhindert wird. Dabei endet jeder neue DNA-Strang an einem zufällig ausgewählten A, C, T oder G. Die Auswertung erfolgte über eine hoch auflösende Acrylamid-Gelelektrophorese, in der sich Sequenzen voneinander trennen lassen, die sich lediglich um ein Nukleotid unterscheiden. Für einen Reaktionsansatz wurden zu 250-300 ng des zu sequenzierenden Plasmides 0,5 µl Primer und 2,5 µl Sequenzier-Premix (AmpliTaq® FS BigDyeTerminator) gegeben und mit H₂O_{dd} auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und gemischt.

Sequenzierreaktion

Denaturierung	96 °C	30 s	} 20-30 Zyklen
Annealing	55 °C	15 s	
Elongation	60 °C	4 min	

Die Aufreinigung der PCR-Produkte und die Gelelektrophorese wurden in der Sequenzierabteilung des Robert-Koch-Institutes durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Internet Programm BLAST (Basis local alignment search tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul et al. 1990).

3.2.1.5. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde der *QIAprep Maxiprep Kit* verwendet. Er basiert auf dem von Birnboim und Doly (Birnboim et al. 1979) beschrie-

benen Verfahren der alkalischen Lyse. Dabei werden die Bakterien unter stark alkalischen Bedingungen lysiert und die bakterielle DNA sowie Proteine denaturiert. Die bakterielle RNA wird bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer anwesende RNase A abgebaut. Die Aufreinigung erfolgt über Anionenaustauscher-Chromatographie mit *Qia-tip 500*-Säulen. Für die Gewinnung von *high copy*-Plasmiden wurden 250 ml, für die Gewinnung von *low copy*-Plasmiden 500 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum aus Glycerolkulturen angeimpft, üN bei 37 °C mit 225 upm inkubiert und anschließend bei 6.000 x g pelletiert. Die Lyse der Bakterien und die Aufreinigung der DNA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.6. Mini-Präparation von Plasmid-DNA zur Charakterisierung transformierter Bakterien

Als verlässliche Schnellmethode hat sich eine Kurzform der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim et al. 1979) bewährt, die nach Fällung und Renaturierung mit den üblichen Puffern P1 bis P3 auf organische Extraktion verzichtet und gleich die Präzipitation der DNA mit Isopropanol anschließt. Dazu wurden 1,5 ml Übernachtskultur 5 min mit 2.000 x g bei 4 °C pelletiert und mit 250 µl Resuspendierungspuffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 und intensivem Mischen erfolgte die Bakterienlyse für 30 s. Der Ansatz wurde mit 250 µl Neutralisierungspuffer P3 10 min auf Eis neutralisiert und 10 min mit 16.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die DNA mittels Isopropanol-Fällung gewonnen. Die Ausbeute und Reinheit der so gewonnenen Plasmid-DNA war für Restriktionsanalysen ausreichend. Sollte die DNA z.B. für Sequenzierungen sehr sauber sein, schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an oder es wurde der *Qiaprep Miniprep* Kit nach Herstellerangaben verwendet.

- **Resuspendierungspuffer P1**

- 50 mM Glucose

- 10 mM EDTA

- 100 µg/ml RNase A; pH 8,0

- **Lysepuffer P2**
200 mM NaOH
1% SDS
- **Neutralisierungspuffer P3**
3 M Kaliumacetat; pH 5,2

3.2.1.7. Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Bei der DNA-Isolierung mittels Phenol/Chloroform-Extraktion werden verunreinigende Proteine, z.B. aus Gesamtzellextrakt von Organismen, selektiv durch Phasentrennung aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Dazu wurde ein Volumen eines Gemisches (1:2) aus Phenol und Chloroform zu der DNA-Protein-Lösung gegeben, gut durchmischt und zur Phasentrennung 15 min bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Durch die organischen Lösungsmittel präzipitieren die Proteine, während sich die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase sammeln. Zur Entfernung des Phenols wurde zur DNA-haltigen Phase ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben und nach gründlichem Durchmischen erneut zentrifugiert. Die DNA konnte anschließend aus der oberen wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt werden.

3.2.1.8. Isopropanol-Fällung von DNA

Isopropanol fällt in Gegenwart von einwertigen Kationen und bei einer Temperatur von -20 °C Nukleinsäuren wirksam aus. Die DNA wurde durch Zugabe von Ammoniumacetat (Endkonzentration: 2-2,5 M) und 0,7 Vol. Isopropanol bei RT (Minimierung der Kopräzipitation von Salzen) aus der Lösung präzipitiert und 15-30 min mit 15.000 x g bei 4 °C pelletiert. Um Salzreste zu entfernen und das Isopropanol durch leichter flüchtiges Ethanol zu verdrängen, wurde das DNA-Salz-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und die DNA 5-15 min mit 15.000 x g bei 4 °C pelletiert. Das Lösen des luftgetrockneten DNA-Niederschlags erfolgte

dann in geeignetem Puffer (um saure Hydrolyse zu vermeiden pH-Wert-Kontrolle: 7,5-8,0).

3.2.1.9. Reinigung von PCR-Reaktionsprodukten

PCR-Reaktionen enthalten neben dem gewünschten PCR-Produkt primerfreie Nukleotide, Salze und Polymerase, deren Abtrennung für eine Verwendung des PCR-Produktes für Klonierungen und andere enzymatische Reaktionen notwendig ist. Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde der *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben verwendet, bei dem durch Adsorption der amplifizierten DNA an eine Silicagel-Membran ein Großteil der nicht erwünschten Verunreinigungen mittels Zentrifugation abgetrennt werden kann. Die Säulchen der *QIAquick column*-Serie besitzen eine Bindungskapazität von 10 µg DNA bei einer Ausbeute von bis zu 95%. Die Elution erfolgte unter Niedrigsalzbedingungen (mit H₂O_{dd}).

3.2.1.10. Reinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben, bei dem nach Ausschneiden der gesuchten Bande die Solubilisierung der Gelmatrix durch chaotrophe Reagenzien, die die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckereinheiten des Agarosepolymers zerstören, erfolgt. Für die Reinigung der DNA aus dem gelösten Gel wurden wiederum die Säulchen der *QIAquick column*-Serie verwendet (Reinigung von PCR-Produkten).

3.2.1.11. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Zur Ermittlung der Nukleinsäure-Konzentration wurde die Absorption (A) der heterocyclischen aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Doppelstrang-DNA und RNA besitzen infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenstapelung verschiedene Absorptionskoeffizienten. Eine Absorption von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml und bei RNA ca. 40 µg/ml. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung ergab die Absorptionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Reste von Proteinen. Gereinigte DNA-Lösungen sollten ein A260/A280-Verhältnis im Bereich von 1,8 bis 2,0 und RNA-Lösungen ein Verhältnis im Bereich von 1,9 bis 2,1 aufweisen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

3.2.1.12. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Sie erzeugen dabei entweder 5'- oder 3'-überhängende Enden einzelsträngiger DNA (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung und Temperatur, bei der die Reaktion optimal (bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit) abläuft. Für einen analytischen Verdau wurden 1-2 µg, für einen präparativen Verdau 20 µg DNA für 1,5 h bei 37 °C restringiert. Für die Abtrennung der Enzyme, Nukleotide und Pufferbestandteile wurde der *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.13. Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den zwei kompatiblen Enden restringierter DNA wurde alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP = *calf intestine alkaline phosphatase*) verwendet. Dazu wurde die zu dephosphorylierende DNA mit 0,1 Vol. 10 x Dephosphorylierungspuffer und der erforderlichen Menge CIP versetzt, wobei 1 U ausreichend für 10 pmol 5'-terminal phosphorylierter DNA-Fragmente ist und folgende Formel gilt:

$$\frac{2 \times 10^6}{660 \times \text{Anzahl bp}} \cong \frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g ds lineare DNA}}$$

Um zu verhindern, dass bei der anschließenden Ligation auch das zu insertierende DNA-Fragment dephosphoryliert wird, musste die CIP nach der Dephosphorylierung aus dem Ansatz entfernt werden. Dazu wurde der *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.14. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Ligase des Phagen T4 katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Verknüpfung benachbarter 5'-Phosphatenden und 3'-Hydroxyenden doppelsträngiger DNA. Die Ligation erfolgt bei einem 3-fachen molaren Überschuss des zu insertierenden DNA-Fragmentes gegenüber dem Vektor:

$$\text{Menge (Insert)} [\text{ng}] = \frac{\text{Menge Vektor} [\text{ng}] * \text{Basenpaare (Insert)} * 3}{\text{Basenpaare (Vector)}}$$

Für eine Standard-Ligation wurden 100 ng restringierter, dephosphorylierter Vektor und die berechnete Menge zu insertierendes DNA-Fragment mit 1 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase zusammengegeben, auf 10 µl mit H₂O_{dd} aufgefüllt und gründlich gemischt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend zur Transformation eines geeigneten *E.coli*-

Stammes verwendet.

3.2.1.15. Transformation von *Escherichia coli*

Um rekombinante Plasmide vermehren zu können, benötigt man transformationskompetente Bakterien, die in der Lage sind, Plasmid-DNA aufzunehmen. Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock. Die bei -70 °C gelagerten, transformationskompetenten Bakterien wurden kurz vor der Verwendung auf Eis aufgetaut. Für eine Transformation wurden 100 µl transformationskompetente Zellsuspension mit DNA-Lösung (Plasmid bzw. Ligationsansatz und restringierter, dephosphorylierter Vektor als Religationskontrolle) gemischt und der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für genau 90 s bei 42 °C und nach Zugabe von 500 µl LB-Medium eine Regenerationsphase von 60 min mit 225 upm bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Platten (50, 100 und 200 µl pro Platte) mit Selektions-Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2. Zellbiologische Materialien und Methoden

3.2.2.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Transformation von Plasmiden oder Ligationsansätzen wurden transformationskompetente *E.coli*-Zellen hergestellt, die in der Lage sind, DNA aufzunehmen. Für die Herstellung von transformationskompetenten Zellen wurden 800 ml LB-Medium mit 10 ml einer üN-Kultur von *E.coli* angeimpft und bis zu einer $OD_{600}=0,5$ bei 37 °C mit 225 upm geschüttelt. Die Zellen wurden steril 5 min mit 4.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und in 50 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 90 min auf Eis inkubiert und 5 min mit 4.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 bis 20 ml TFB2 vorsichtig resuspendiert und aliquotiert in einem Ethanol-Trockeneis-Gemisch eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

- **TFB1-Puffer, pH 5,8**

100 mM Rubidiumchlorid

50 mM Manganchlorid

30 mM Kaliumacetat

10 mM Calciumchlorid

15% Glycerol

in H₂O_{dd} gelöst und sterilfiltriert; Vorratslösung bei 4 °C gelagert

- **TFB2-Puffer, pH 6,8**

10 mM MOPS

10 mM Rubidiumchlorid

75 mM Calciumchlorid

15 % Glycerol

in H₂O_{dd} gelöst und mit KOH auf pH 6,8 eingestellt

sterilfiltriert; Vorratslösung bei 4 °C gelagert

3.2.2.2. Anlegen von Glycerolkulturen

Für die Aufbewahrung von Bakterien über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In glycerolhaltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lange lagern, ohne ihre Vitalität zu verlieren. Für Glycerolkulturen wurden 850 µl Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase mit 150 µl sterilem Glycerol gründlich gemischt und bei -70 °C eingefroren.

3.2.2.3. Induktion der Biosynthese prokaryontischer Proteine

Bei den verwendeten Expressionsplasmiden liegt das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines *lacI*-abhängigen Repressors, der vom Expressionsstamm *E.coli* K12 SG13009 konstitutiv gebildet wird (kodiert auf dem Plasmid pREP4). Durch die Bindung des Repressormoleküls an den Operator des *lac*-Operon ist der Promotor in einen inaktiven Zustand versetzt. Die Proteinbiosynthese kann

durch die Zugabe des Lactosederivates **I**sopropyl-beta-D-**t**hiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden, das durch die Bindung an den *lacI*-Repressor seine Dissoziation vom Operator und damit die Transkription der nachgeschalteten Gensequenzen bewirkt.

Schüttelkultur

In einem Schikanekolben wurden 1000 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotika mit 50 ml Übernachtskultur inokuliert und mit 225 upm bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert. Die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) induziert und die Bakterien für 3 h weiter kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4.000 x g sedimentiert, 1x mit PBS gewaschen und bei -20 °C üN eingefroren.

Fermentation

Fermentationen im 1,5 l-Maßstab wurden in einem 3 l-Fermenter der Fa. New Brunswick bioscience durchgeführt. In den Fermenter wurden 1.300 ml gelöstes LB-Medium eingefüllt und der Deckel mit dem Scheibenblattrührer aufgesetzt und verschraubt. Eine kalibrierte pH-Elektrode, eine pO_2 -Elektrode und eine Levelsonde für die Schaumkontrolle wurden in die entsprechenden Deckelstutzen eingeführt und verschraubt. Der Fermenter mit angeschlossener Antischaummittelflasche wurde 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert und nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit der Steuereinheit verbunden. Nach dem Aufsetzen des Motors für den Scheibenblattrührer, Anschluss der Wasserzu- und Wasserabfuhr an den Abluftkühler und Einsetzen des pT100-Temperaturfühlers, wurde der Fermenter über die Steuereinheit auf folgende Konditionierungsparameter eingestellt:

Parameter	Symbol	Einheit	Sollwert
Temperatur	T	°C	37
Rührerdrehzahl	N	Upm	200
Begasungsrate	V_G	l/h	2

Nach Erreichen stabiler Konditionierungsparameter und einer stabilen Gelöstsauerstoffkonzentration wurde die pO_2 -Elektrode kalibriert. Unter aseptischen Bedingungen erfolgte die Zugabe der Selektionsantibiotika. Folgende Betriebsparameter wurden für die Fermentation vorgegeben:

Parameter	Symbol	Einheit	Sollwert	Steuerung
Temperatur	T	°C	37	über Mantelheizung
Rührerdrehzahl	N	Upm	200-600	kaskadiert über Gelöstsauerstoffkonzentration
Gelöstsauerstoffgehalt	pO_2	%	40	Begasungsrate V_G Rührerdrehzahl N

der pH Wert wurde protokolliert, jedoch nicht geregelt

Der Fermenter wurde unter aseptischen Bedingungen 1:20 mit Übernachtskultur inokuliert und bis $OD_{600} = 4-5$ inkubiert. Die Proteinsynthese wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase (Verfolgen der Wachstumskurve durch stündliche offline-Bestimmung der OD_{600}). Anschließend wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation geerntet.

3.2.2.4. Homogenisierung und Zellaufschluss von Bakterien

Für den Aufschluss der Bakterienzellen wurden Ultraschallwellen genutzt, die durch schnelle Druckänderungen und die daraus resultierenden Kavitationen und Scherkräfte die Zellen sehr effizient aufschließen. Um die freigesetzten Proteine vor proteolytischem Abbau zu schützen, wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt. Da bei dem Zellaufschluss mit Ultraschallwellen viel Wärme freigesetzt wird, erfolgten alle Arbeiten unter Kühlung. Die Bakterienzellen wurden mit 5 ml Lysepuffer/g Feuchtmasse resuspendiert und auf Eis wie folgt sonifiziert:

- 1 x 1 min 50% Zyklus 10% Leistung
- 3 x 1 min 50% Zyklus 50% Leistung
- 1 x 1 min 50% Zyklus 100% Leistung

Die Suspension wurde 30 min mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

- **Lysepuffer**, nativ

50 mM Tris-Cl; pH 8,0

Vor Gebrauch wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt, so dass die Konzentration an PMSF 1 mM, an Aprotinin 1 µg/ml und an Leupeptin 1 µg/ml betrug.

3.2.2.5. Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen

Alle Arbeiten, die steril ablaufen mussten, wurden in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Für die Kultivierung der Zellen wurde sterile Plastikware (Pipetten, Zellkulturflaschen, Zentrifugenröhrchen, Petrischalen, 24-Loch-Platten) verwendet. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Alle in Zellkultur befindlichen Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mittels PCR von den Zellkulturüberständen auf Kontaminationen mit Mycoplasmen untersucht. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche bzw. bei Erreichen einer 70%igen Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA/50 cm² ca. 3-5 min bei 37 °C trypsiniert und nach Ablösen vom Untergrund in Kultivierungsmedium resuspendiert (FCS inhibiert Trypsin). Jeweils 10⁵ Zellen pro ml eingesetztem Medium (0,2-0,5 ml pro cm² Wachstumsfläche) wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit Kultivierungsmedium aufgefüllt.

- **Kultivierungsmedium**

DMEM

10% FCS

1% Natriumpyruvat

1% Glutamin

1% Pen/Strep

- **Trypsin/EDTA**

- 0,05% Trypsin

- 0,02% EDTA

3.2.2.6. Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden die trypsinisierten Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergerät mit einer kontrollierte Abkühlrate von 1 °C pro Minute auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

- **Einfriermedium**

- Kultivierungsmedium

- 30% FCS

- 10% DMSO

3.2.2.7. Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden in einem 37 °C Wasserbad angetaut und in ein großes Volumen kalten Auftaumediums überführt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen in 5 ml warmem Auftaumedium resuspendiert und in eine T 25 (25 cm²) Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

- **Auftaumedium**

- DMEM

- 20% FCS

- 1% Natriumpyruvat

- 1% Glutamin

3.2.2.8. Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Neubauer Hä-mocytometer

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einem Neubauer Hämocytometer. Während lebende Zellen den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen können, kann der Farbstoff durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen eindringen und die Zellen tiefblau färben. Die trypsinierten Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert (ca. 10^5 Zellen/ml) und ein Aliquot 1:2 mit Trypanblaulösung versetzt. Mittels Kapillarkräften wurde eine Kammer des Neubauer Hämocytometers mit der gefärbten Zellsuspension gefüllt und die nicht gefärbten Zellen von vier Großquadraten des Zählfeldes ausgezählt. Da ein Großquadrat bei aufgelegtem Deckgläschen einer Fläche von 1 mm^2 entspricht, ergibt sich bei Einbeziehung der Tiefe der Zählkammer von 0,1 mm und der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau folgende Lebendzellzahl

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} * 10^4 * 2$$

- Trypanblaulösung
0,5% (w/v)

3.2.2.9. Liposomale Transfektion von adhärennten Zellen

Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wurde das Verfahren der liposomalen Transfektion genutzt, bei dem ein DNA-Liposomen-Gemisch (eine Mischung aus polykationischen Lipiden zur Bindung der DNA und neutraler Lipide) endozytotisch aufgenommen wird. Die zu transfizierenden Zellen wurden trypsiniert und die Lebendzellzahl bestimmt. In einer 6-cm-Schale wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen ausgelegt und bis zu einer 60-80%igen Konfluenz kultiviert. Für die Transfektion wurden 5 µg DNA mit Kultivierungsmedium ohne FCS auf ein Gesamtvolumen von 50 µl und 32 µl Transfektionsreagenz (DOTAP oder Lipofectamin) auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Die DNA-Lösung wurde mit der Transfektionslösung gemischt und maximal 15 min bei RT für die Ausbildung der DNA-Liposomen-Komplexe inkubiert. Das DNA-Liposomen-Gemisch wurde mit 5

ml Kultivierungsmedium mit 0,5% FCS vermischt und für 3-4 h auf die mit Kultivierungsmedium gewaschenen Zellen gegeben. Für die weitere Kultivierung der Zellen wurde das Transfektionsmedium durch Kultivierungsmedium ersetzt.

3.2.2.10. Selektionierung auf stabile Expression und Isolierung resistenter Klone

Als Selektionsmarker für die Generierung stabil exprimierender Hepatomzellen diente das *neo*-Gen. Zur Selektion wurde das Aminoglycosidantibiotikum Geniticin (G418) eingesetzt, welches an das 80S Ribosom bindet und bei nicht stabil transfizierten Zellen die Translation hemmt. Für die Transfektion wurden 60% konfluente Hepatom(HepG2)-Zellen mit je einem eukaryontischen Expressionsplasmid mittels liposomaler Transfektionsreagenz für 3-6 h transfiziert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen Kultivierungsmedium mit einer Geniticinkonzentration von 700 µg pro ml ausgetauscht. Die verwendete Geniticinkonzentration wurde vorher an parental HepG2-Zellen ausgetestet. Der benötigte Zeitraum, um nicht stabil transfizierte Zellen abzutöten, variierte mit der Aussaatdichte und dem proliferativen Status. In der Regel dauerte es 10- 14 Tage, um resistente Zellpopulationen isolieren zu können. Distingte Zellen wurden mittels steriler Pipettenspitze gepickt und für die Expandierung in 24-Loch-Platten überführt. Bis ausreichend Material für eine Charakterisierung zur Verfügung stand, wurden die Zellen in G418-haltigem Kultivierungsmedium vermehrt.

3.2.2.11. Proliferationstest: Sulforhodamin B (SRB)-Test

Proliferationstests dienen der quantitativen Bestimmung des Zellwachstums bzw. des cytotoxischen Effektes. Der SRB-Test (Skehan et al. 1990) beruht auf der Bindung des Protein-Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) und kann eine Inhibierung des Zellwachstums durch zellschädigende Substanzen detektieren. Das entstehende lösliche Sulforhodamin B kann spektrophotometrisch quantifiziert werden. Die ermittelte Absorption verhält sich direkt proportional zur Zellzahl. In die Vertiefungen einer 24-Lochplatte wurden 1×10^4 Zellen mit 0,5 ml Kultivie-

rungsmedium ausgelegt und kultiviert. Dabei wurde jede Probe als Vierfachbestimmung angesetzt. Nach 24 h wurde das Kultivierungsmedium durch Medium mit cytotoxischer Substanz (5FC) in verschiedenen Konzentrationsstufen ersetzt und alle 2 Tagen erneuert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen auf Eis mit vorgekühltem PBS-Puffer gewaschen und mit 125 µl/Vertiefung eiskalter Fixierlösung für 60 min auf Eis fixiert. Nach 4 x Waschen mit H₂O_{dd} wurden die Zellen mindestens 12 h bei 37 °C getrocknet (die 24 Lochplatten können an diesem Punkt unbegrenzt gelagert werden). Je 250 µl/Vertiefung Färbelösung wurden zugeben, um die Zellen für 20-30 min bei RT zu färben. Die überschüssige Färbelösung wurde mit 1%-Essigsäure-Lösung solange ausgewaschen, bis die Waschlösung farblos blieb (ca. 3x waschen). Anschließend wurden die gefärbten Zellen für mindestens 3-6h bei 37 °C getrocknet (die spektrophotometrische Messung sollte spätestens 48h nach dem 2. Trocknen stattfinden). Die Solubilisierung des aufgenommenen SRB-Farbstoffes erfolgte durch Zugabe von 500 µl Solubilisierungslösung/Vertiefung für 5 min. Die Farbstofflösung wurde in 96-Lochplatten mit rundem Boden überführt (pro Loch jeweils 3 Aliquots á 80 µl). Die Messung der Absorption im ELISA-Reader erfolgte bei 565 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm). Gegebenenfalls musste mit Solubilisierungslösung verdünnt werden, da nur Absorptionswerte von unter 1,8 im linearen Bereich der Messung lagen.

- **Fixierlösung**
TCA 10% (w/v)
- **Färbelösung**
SRB 0,4% (w/v)
in 1% Essigsäure lösen
- **Essigsäure-Lösung**
1% (v/v)
- **Solubilisierungslösung**
Tris base 10 mM

3.2.2.12. Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden trypsinierte und mit PBS-Puffer gewaschene Zellen (5×10^5 Zellen) in 500 μ l NTE 150-Puffer resuspendiert, mit 50 μ l Proteinase-K-Lösung (Endkonzentration 100 μ g/ml) und 15 μ l SDS-Stammlösung (Endkonzentration ca. 0,5%) versetzt und 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l NTE 650-Puffer wurde die genomische DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Isopropanol gefällt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in TE-Puffer gelöst (Wasser fördert die saure Hydrolyse).

- **NTE 150-Puffer**

150 mM NaCl

10 mM Tris-Cl, pH 7,5

10 mM EDTA

in H_2O_{dd} gelöst und sterilfiltriert; Vorratslösung bei RT gelagert

- **NTE 650-Puffer**

650 mM NaCl

10 mM Tris-Cl, pH 7,5

10 mM EDTA

in H_2O_{dd} gelöst und sterilfiltriert; Vorratslösung bei RT gelagert

3.2.2.13. Präparation von Gesamtproteinextrakt

Die mit PBS-Puffer gewaschenen Zellen wurden auf Eis mit 500 μ l/ 5×10^5 Zellen Triton-X-100-Lysepuffer 10 min lysiert und mit einem Zellschaber vollständig vom Untergrund gelöst. Um ein homogenes Zelllysät zu erhalten, wurde die Zellsuspension auf Eis 3 x mit einer Spritze mit dünner Kanüle (0,7x30 mm) genadelt und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min mit 16.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Proteinbestimmung (Bradford) erfolgte ein Konzentrationsabgleich durch Zusatz von Lysepuffer. Das Pellet wurde verworfen.

- **Triton X-100-Lysepuffer**

137 mM NaCl

200 mM Tris-Cl; pH 8,0

0,1% Triton X-100

Vor Gebrauch wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt, so dass die Konzentration an PMSF 1 mM, an Aprotinin 1 µg/ml, an Leupeptin 1 µg/ml betrug.

3.2.2.14. Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation nutzt die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit verschiedener Teilchen und kann zur Fraktionierung von Zellbestandteilen genutzt werden. Dabei pelletieren unaufgeschlossene Zellen und Zellkerne bereits bei 1.000 g/15 min, Kernmembranen und Plasmamembranen bei 1.500 g/15 min, Mitochondrien, Peroxisomen und Lysosomen bei 10.000 g/25 min und Mikrosomen bei 100.000 g/1 h. Die verbleibende cytosolische Fraktion enthält alle löslichen Proteine. Um die freigesetzten Proteine vor proteolytischem Abbau zu schützen, erfolgten alle Arbeiten unter Kühlung und es wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt. Die Zellen wurden mittels Zellschaber im Kultivierungsmedium abgeschabt und nach dem Zentrifugieren für 5 min mit 200 x g bei 4 °C mit PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde mit kaltem Homogenisierungspuffer (250 µl/10⁶ Zellen) resuspendiert und mit 25 Hüben im Douncer-Potter auf Eis aufgeschlossen. Die Überprüfung des vollständigen Zellaufschlusses erfolgte mikroskopisch. Das Homogenat wurde 15 min mit 1.500 x g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand nach der 1. Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 25 min mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet aus dem 1. Zentrifugationsschritt (Debris, unaufgeschlossene Zellen, Zellkerne) wurde mit 250 µl Homogenisierungspuffer gewaschen und als Pellet P1 bei -20 °C eingefroren. Der Überstand nach der 2. Zentrifugation wurde wieder in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 18 min mit 430.000 x g (entspricht 60 min mit 100.000 x g) bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet aus dem 2. Zentrifugationsschritt (Endosomen und Lysosomen) wurde mit 250 µl Homogenisierungspuffer gewaschen und als Pellet P2 bei -20 °C eingefroren. Der Überstand nach der 3. Zentrifugation wurde in neues Reaktionsgefäß über-

führt und bei -80 °C als cytosolische Zellfraktion eingefroren. Das Pellet aus dem 3. Zentrifugationsschritt (Mikrosomen) wurde mit 250 µl Homogenisierungspuffer gewaschen und als Pellet P3 bei -20 °C eingefroren.

- **Homogenisierungspuffer**

50 mM Tris-Cl pH 7,8

5 mM MgCl₂

30 mM KCl

250 mM Sucrose

Vor Gebrauch wurden 5 mM DTT und Proteaseinhibitoren zugesetzt, so dass die Konzentration an PMSF 1 mM, an Aprotinin 1 µg/ml, an Leupeptin 1 µg/ml betrug.

3.2.3. Proteinchemische Methoden

3.2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der absorbierenden Substanz genutzt. Dieses Abhängigkeitsverhältnis lässt sich als Steigung bei der Auftragung von Absorption gegen die Konzentration beschreiben und wird als molarer spektraler Absorptionskoeffizient bezeichnet. Für die Bestimmung der Konzentration ergibt sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = \frac{A}{\varepsilon * d}$$

c = Konzentration in mol/l = M

A = Absorption

d = Schichtdicke der Küvette in cm

ε = molarer spektraler Absorptionskoeffizient (mol/l)⁻¹ * cm⁻¹

3.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) basiert auf der Fähigkeit von *Coomassie blue G250* an Arginine und aromatische Aminosäurereste zu binden, was einen konzentrationsabhängigen Farbumschlag nach blau bewirkt. Die Absorption der Proben kann bei 595 nm gemessen werden.

3.2.3.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ist ein von Laemmli (Laemmli 1970) etabliertes Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenden Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt werden. Im Bereich der Sättigung werden 1,4 g SDS pro 1 g Polypeptid gebunden. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Molekulargewichtsstandard). Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 10% SDS-Polyacrylamid-Gele mit einem 5% Sammelgel gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Fünftel 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgt mit konstanter Spannung bei 90 V, die Auftrennung des Proteingemisches bei 120 V und Wasserhinterkühlung. Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde ein LMW-Marker verwendet.

- **Sammelgelpuffer (4fach)**

0,5 M Tris-Cl pH 6,8

0,4% SDS

- **Trenngelpuffer (4fach)**
1,5 M Tris-Cl, pH 7,5
0,4 %SDS
- **10fach Elektrophorese-Laufpuffer**
30,28 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS ad 1000 ml H₂O_{dd}
- **5fach SDS-Probenpuffer** (reduzierend)
0,25 M Tris-Cl pH 6,8
20% Glycerol
8% SDS
8% β- Mercaptoethanol
0,1 g Bromphenolblau

3.2.3.4. Coomassie-Färbung

Die Nachweisgrenze für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau liegt im Bereich von 0,1-2 µg Protein pro Bande. Zur Färbung der Proteine wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel nach erfolgter Gelelektrophorese 30 min in Färbelösung geschwenkt und nachfolgend bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden mit Entfärbelösung gewaschen.

- **Färbelösung**
0,1% Coomassie Brilliant Blau R250
10% Essigsäure
25% Ethanol
- **Entfärbelösung**
25% Ethanol
10% Essigsäure

3.2.3.5. Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

Zum Nachweis geringer Proteinmengen (bis zu 3 ng) wird die Silberfärbung nach Heukeshoven (Heukeshoven et al. 1988) angewendet. Das Prinzip beruht auf der Komplexbildung von Silberionen mit Aminosäureseitenketten, insbesondere mit Sulfhydryl- sowie Carboxylgruppen. Nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel für 30 min unter Schwenken mit Fixierer fixiert und nachfolgend für 20 min unter Schwenken mit Konditionierer inkubiert. Nach intensivem Waschen mit H_2O_{dd} wurde das Gel für 20 min in Färbelösung geschwenkt und ca. 2 min in Entwickler inkubiert. Die Entwicklung wurde je nach Intensität der Banden mit Stopplösung terminiert.

- **Fixierer**

30% Ethanol

10% Essigsäure

- **Konditionierer**

30% Ethanol

0,1% $Na_2S_2O_3 \cdot 2H_2O$

0,5% Glutaraldehyd

0,4 M Natriumacetat (Stammlösung 2 M, pH 6,0)

- **Färbelösung**

0,1% Silbernitrat (Stammlösung 20%)

0,00925% Formaldehyd (Stammlösung 37%)

- **Entwickler**

2,5% Dinatriumcarbonat

0,015% Formaldehyd (Stammlösung 37%)

- **Stopplösung**

5% Essigsäure

3.2.3.6. Ponceau S-Färbung

Zur Färbung und Fixierung von Proteinen nach dem Elektrotransfer auf eine proteinbindende Membran wurde diese für 3 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Überschüssiges Ponceau S wurde nachfolgend mit Wasser ausgewaschen.

- **Ponceau S-Lösung**

2% Ponceau S

3% TCA

3.2.3.7. Westernblotting

Beim Westernblotting liegt die Sensitivität der Nachweisreaktion, je nach Visualisierungssystem, im Bereich von 0,1-100 fmol, wobei die Sensitivität von der Konzentration des Proteins und der Größe des Gels abhängt. Das Westernblotting besteht aus 3 Teilschritten: dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine, einer Immunreaktion sowie der Visualisierung.

3.2.3.8. Elektrotransfer im semi-dry-Verfahren

Unmittelbar nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte durch das Anlegen einer Spannung der Transfer der getrennten Proteine aus dem Gel auf eine mit Methanol rehydratisierte, proteinbindende Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF). Für den Zusammenbau des Blot-Sandwichs wurden 4 Whatmanpapiere getränkt in Anodenpuffer I, 2 Whatmanpapiere in Anodenpuffer II, die rehydratisierte PVDF-Membran, das Trenngel und 6 Whatmanpapiere getränkt in Kathodenpuffer luftblasenfrei horizontal zwischen zwei Plattenelektroden übereinander geschichtet. Der Proteintransfer erfolgt bei konstantem Strom von 1 mA pro cm² für 50 min. Die Überprüfung der Transfereffizienz erfolgte mit einer Ponceau S-Färbung.

- **Anodenpuffer I**

300 mM Tris

20% Ethanol

- **Anodenpuffer II**

25 mM Tris

20% Ethanol

- **Kathodenpuffer**

40 mM Capronsäure

20% Ethanol

3.2.3.9. Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers

Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Blotmembran für 30 min bei RT in Blockierungslösung geschwenkt. Die Bindung des Primärantikörpers, verdünnt in Blockierungslösung, erfolgte für 1 h bei RT unter Schwenken. Nach intensivem Waschen mit PBS-T wurde die Blotmembran mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper 1:2.000 in Blockierungslösung verdünnt, für 45 min bei RT unter Schwenken inkubiert und anschließend erneut mit PBS-T intensiv gewaschen.

- **PBS-T**

PBS-Puffer

0,05% Tween 20

- **Blockierungslösung**

10% Magermilchpulver in PBS-T

3.2.3.10. Visualisierung: ECL-Detektionssystem

Die Visualisierung erfolgte mit dem „Enhanced-Chemiluminescence System“ (ECL), einer nicht radioaktiven Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase (HPR) konjugierten Antikörpern markiert wurden. Nach dem Zusammenmischen der Detektionslösungen I und II zu gleichen Teilen katalysieren die HPR und H_2O_2 die Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylhydrazid. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und geht unter Lichtemission wieder in seinen Grundzustand zurück. Die Lichtemission kann über die Belichtung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden. Die Chemilumineszenz erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab.

3.2.3.11. Intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung für die FACS-Analyse

Um eukaryontische Zellen auf die Bildung von Proteinen zu analysieren, wurde das Verfahren der intrazellulären Markierung mit anschließender FACS-Analyse gewählt. Für die Markierung wurden 5×10^5 Zellen durch Trypsinieren geerntet und 1 x mit PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 100 μ l PBS resuspendiert und nach Zugabe von 100 μ l 4% Formaldehydlösung 20 min bei RT fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen. Bis zur Markierung wurden die fixierten Zellen bei 4 °C in FACS-PBS gelagert. Für die Markierung der intrazellulären Proteine war es notwendig, die Zellmembran durch den Zusatz der Detergenz Saponin zu permeabilisieren. Der Primär- und der Sekundärantikörper wurden deshalb in FACS-PBS mit Saponin verdünnt und alle Waschschritte mit saponinhaltigem FACS-PBS durchgeführt. Für die Markierung wurden die fixierten Zellen zentrifugiert und in 50 μ l Primärantikörperlösung resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x gewaschen und anschließend im Dunkeln mit 50 μ l Sekundärantikörperlösung 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 200 μ l

FACS-PBS resuspendiert. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte mit einem FACS Calibur (Beckton-Dickinson, San Jose, USA). Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit dem Programm Cell Quest (Beckton-Dickinson, San Jose, USA).

- **4 % Formaldehydlösung**

verdünnt in PBS-Puffer

- **FACS-PBS**

PBS-Puffer

2,5 % FCS

0,1 % NaN₃

- **FACS-PBS/Saponin**

0,5 % Saponin

FACS-PBS

3.2.3.12. Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in Zellen wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird einstrahlendes Licht, das sog. Erregerlicht, vom Fluoreszenzfarbstoff absorbiert. Dabei geben die Photonen ihre Energie an die Atome ab, die sie verbrauchen, um in einen angeregten Zustand überzugehen. Fallen sie wieder auf einen energieärmeren Zustand zurück, geben sie die bei der Absorption aufgenommene Energie wieder ab. Ein Teil dieser Energie wird dann in Form von Licht abgestrahlt und kann im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden 1×10^4 Zellen pro Deckgläschen in einer 24-Lochplatte ausgesät und 24-36 h kultiviert. Zum Fixieren wurden die Zellen 1 x mit PBS-Puffer gewaschen, mit eiskaltem Ethanol versetzt und 10 min bei -20 °C inkubiert. Das Ethanol wurde abgenommen und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Deckgläschen mit den Zellen 30 min bei RT

mit Blockierungslösung inkubiert. Dann folgte die Inkubation der Zellen für 1 h mit primärem Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung. Nach intensivem Waschen mit PBS-T erfolgte für 45 min die abgedunkelte Inkubation des sekundären Antikörpers, verdünnt in Blockierungslösung, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet war. Nachfolgend wurden die Deckgläschen mit den Zellen erneut intensiv gewaschen und umgekehrt auf Objektträger mit Eindeckellösung (zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes vor dem Ausbleichen) überführt und mit Nagellack eingedeckelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Deutschland), welches eine reale dreidimensionale Auflösung ermöglicht.

- **Blockierungslösung**

10% BSA in PBS-T

- **PBS-T**

PBS/0,05% Tween 20

3.2.3.13. Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse diente der Entsalzung bzw. dem Austausch des Puffersystems von Proteinlösungen. Dabei lässt die Dialysemembran kleine Moleküle frei diffundieren, während Moleküle, die größer als die Membranporen (*cutoff*, Ausschlussgröße) sind, zurückgehalten werden. Die Diffusionsrate durch die Membran und damit eine effektive Entsalzung wird im Wesentlichen durch den Konzentrationsgradienten der diffundierbaren Teilchen bestimmt. Um diesen Konzentrationsgradienten an der Membranoberfläche möglichst groß zu halten, wurde der Dialysepuffer einige Male gewechselt.

3.2.3.14. Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)– Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption des Proteins an einen spezifischen, matrixgebundenen Bindungspartner. Bei der von Porath eingeführten immobilisierten Metallchelate Affinitäts Chromatographie (IMAC) (Porath et al. 1975) ist Nitrilotriessigsäure (NTA) an das Säulenmaterial (z.B. Agarose) gebunden. Ein multivalentes Übergangsmetall-Ion (Ni^{2+}) kann mit NTA vier koordinative Bindungen eingehen. Dieses Material ermöglicht die Reinigung rekombinanter Proteine, bei denen ein Polyhistidin- Schwanz (6xHis-Tag) eingeführt wurde. Der 6xHis-Tag bildet mit dem Nickel einen oktaedrischen Komplex, wobei die zwei freien Koordinationsstellen des Nickels mit freien Elektronenpaaren des Histidins besetzt werden. Die Häufung von His-Resten ermöglicht eine starke Bindung. Als eluierendes Agens wird ein Puffer mit steigender Konzentration an Imidazol verwendet, das mit der funktionellen Gruppe des Histidins um die Bindungsstellen des Ni-NTA konkurriert und diese mit steigender Konzentration verdrängt. Zur Vermeidung proteolytischen Abbaus wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt und alle Arbeiten erfolgten unter Kühlung. Die Verwendung von EDTA und anderen Chelatbildnern sowie DTT musste unterbleiben, um die Ni^{2+} -Ionen des Säulenmaterials nicht zu chelatisieren bzw. zu reduzieren. Das 0,2 μm filtrierte proteinhaltige Zelllysat wurde mit Lysepuffer mit einem Fluss von 0,5-1 ml/min auf eine mit 2 ml Ni-NTA-Agarose gefüllte und mit Lysepuffer äquilibrierte Chromatographie-Säule geladen. Um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu lösen, wurde die Säule mit Waschpuffer bis zur Stabilisierung der Absorption bei 280 nm gewaschen. Nachfolgend wurden die mit Histidin markierten Proteine mit ansteigendem Imidazol-Gradienten (bis 100 % Elutionspuffer) von der Ni-NTA-Säule in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Reinigung von 6xHis-getagten Proteinen erfolgte mit einem Äkta *explorer*- bzw. Äkta *purifier*-FPLC-System (AP Biotech).

- **Lysepuffer**, nativ

50 mM Tris-Cl, pH 8,0

10 mM Imidazol

- **Waschpuffer**, nativ
50 mM Tris-Cl, pH 8,0
20 mM Imidazol
- **Elutionspuffer**, nativ
50 mM Tris-Cl, pH 8,0
250 mM Imidazol

3.2.3.15. Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie (Größenausschlusschromatographie) trennt gelöste Proteine nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Einwanderung der Proteine in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße.

3.2.3.16. Affinitätschromatographie mit ligandgebundener Matrix zur Reinigung von Antikörpern

Das Trägermaterial (z.B. Sepharose) besitzt funktionelle Gruppen, an denen 6-Aminohexansäure durch chemische Reaktion kovalent über einen Abstandshalter (*Spacer*) immobilisiert ist. Die Carboxylgruppe der 6-Aminohexansäure ist durch Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Diese NHS-aktivierte Affinitätsmatrix kann für die Kopplung von Proteinen (spezifischer Ligand) genutzt werden. Die primären Aminogruppen der Proteine werden dabei sehr stabil über eine CO-NH Verknüpfung gebunden. Die ligandgebundene Affinitätschromatographie wurde für die Affinitätsreinigung von Antikörpern genutzt. Hierzu wurde NHS-aktivierte Sepharose mit 10-15 Vol. kalter 1 mM HCl über eine Fritte gewaschen. Die mit Kopplungspuffer äquilibrierte Sepharose wurde über Nacht bei 4 °C mit ca. 2,5 mg Antigen, verdünnt in Kopplungspuffer, unter Schwenken inkubiert. Die freien Bindungsstellen der sedimentierten antigengekoppelten Sepharose wurden 2 h mit Blockierungspuffer blockiert. Um die über ionische Wechselwirkungen gebundenen Proteine zu entfernen, wurde das gekoppelte Material 6x alternierend mit Waschpuffer I und II gewaschen. Für die

Reinigung von Antikörpern aus Seren wurde das Säulenmaterial mit PBS-Puffer äquilibriert und in eine Chromatographiesäule gepackt. Das filtrierte Antiserum wurde mit einem Fluss von 0,2 ml/min auf die äquilibrierte Chromatographiesäule geladen und die Säule solange gewaschen, bis sich die Absorption bei 280 nm stabilisiert hat. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit Elutionspuffer eluiert und sofort mit Neutralisierungslösung bis zu einem physiologischen pH-Wert neutralisiert. Die Antikörperlösung wurde gegen PBS dialysiert und mit 20% Glycerol und 0,1% Natriumazid versetzt und bei -70 °C gelagert.

- **Kopplungspuffer**
0,2 M NaHCO_3 , pH 8,0
0,5 M NaCl
- **Blockierungspuffer**
100 mM Tris-Cl, pH 8,0
- **Waschpuffer I**
100 mM Tris-Cl, pH 8,0
500 mM NaCl
- **Waschpuffer II**
100 mM Na-Acetat, pH 4,0
500 mM NaCl
- **Elutionspuffer**
100 mM Glycin-Cl, pH 2,7
- **Neutralisierungslösung**
1 M Tris-Cl, pH 8,8

3.2.3.17. Erzeugung polyklonaler Antikörper

Die Immunisierung von Kaninchen wurde unter Einhaltung der „Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren“ (W. Nicklas, K. Cußler und J. Hartinger, Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.) durchgeführt. Für die Erzeugung des polyklonalen Antiserums gegen bakterielle Cytosin Desaminase wurden Kaninchen mit 100 µg rekombinantem Protein Cytosin Desaminase-HBV-TLM-6His in Abständen von 2-4 Wochen immunisiert. Für die initiale Immunisierung wurde das Protein 1:2 mit komplettem Freund's Adjuvans gemischt und subkutan in die Flanke injiziert. Die nachfolgenden Booster-Immunisierungen wurden mit inkomplettem Freund's Adjuvans durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Prokaryontische Fusionsproteine

4.1.1. Biochemische Charakterisierung prokaryontisch hergestellter Suizidproteine

4.1.1.1. Subklonierung

Um zellpermeable HBV-*TLM*-bCD-Fusionsproteine für eine biochemische und funktionelle Charakterisierung in ausreichender Menge und Reinheit gewinnen zu können, wurden prokaryontische Expressionsplasmide für die Proteinbiosynthese in *E.coli* subkloniert. Als Insert enthielten die prokaryontischen Expressionsplasmide die Nukleotidsequenz für das Zellpermeabilität vermittelnde HBV-*TLM*, fusioniert an die Nukleotidsequenz für die bCD.

4.1.1.2. Prokaryontische Plasmidkonstrukte

Die fusionierten Nukleotidsequenzen für die Fusionsproteine wurden über eine Standard-PCR erzeugt. Als Matrize diente das eukaryontische Expressionsplasmid pCDNA3-bCD (freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Lauer, Tübingen zur Verfügung gestellt), bei dem das bakterielle Startcodon GTG über Mutation durch ATG ersetzt wurde. Mittels sequenzspezifischer Überhangoligonukleotide wurde am 3'- oder 5'-Ende der bCD-Sequenz die für die Zellpermeabilität kodierende Sequenz des HBV-*TLM*'s fusioniert (Abb. 7) sowie beidseitig eine *Bam*HI-Schnittstelle für das Einfügen in einen Klonierungsvektor hinzugefügt. Folgende Expressionskonstrukte wurden erzeugt:

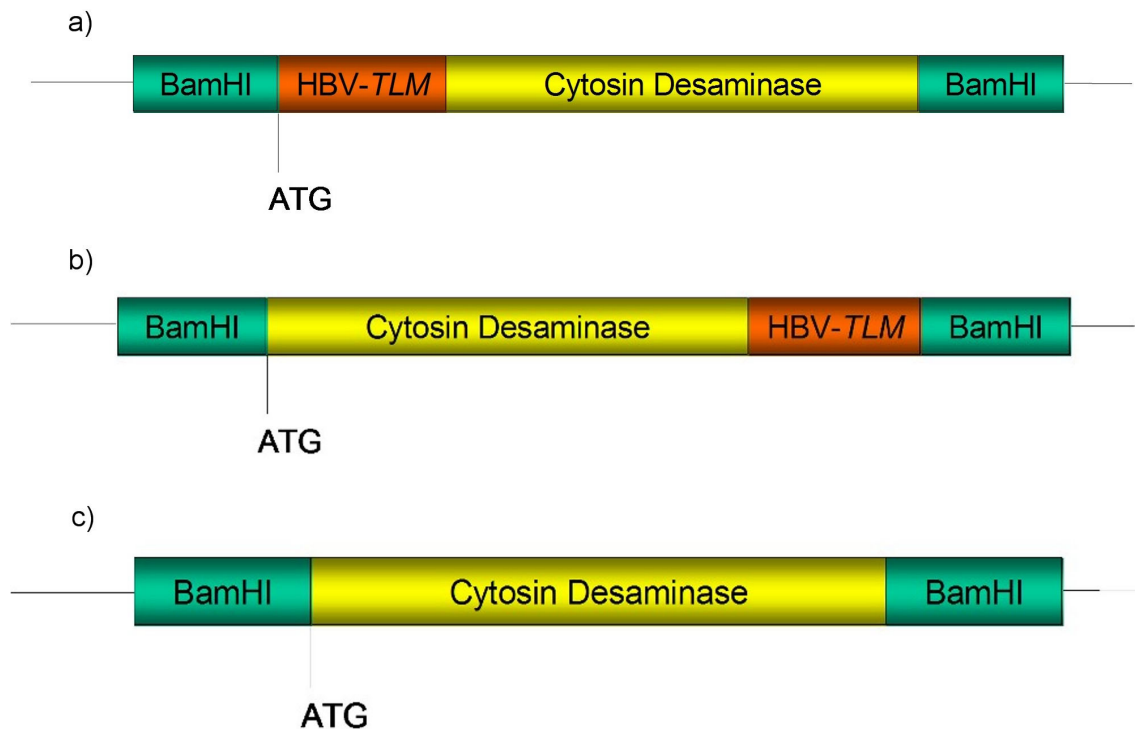


Abb. 7: Schematische Darstellung der prokaryontischen Expressionskonstrukte

a) HBV-TLM-bCD-6His

b) bCD-HBV-TLM-6His

c) bCD-6His (Wildtyp-wt)

bestehend aus der Nukleotidsequenz für die bakterielle Cytosin Desaminase mit mutiertem Startcodon. Bei den zellpermeablen Konstrukten wurde am 3'-bzw. 5'-Ende mittels Überhangoligonukleotiden die Nukleotidsequenz für das HBV-TLM fusioniert.

Über die restringierten *BamHI*-Schnittstellen wurden die erzeugten Expressionskonstrukte mit *BamHI*-restringierten, dephosphorylierten prokaryontischen Expressionsvektoren ligiert. Als Grundlage für die Subklonierung der verschiedenen prokaryontischen Expressionsplasmide dienten die Klonierungsvektoren pQe8 und pQe60 der Fa. Qiagen. Diese Vektoren fügen N- bzw. C-terminal einen 6His-Tag an die synthetisierten Proteine an, der eine Reinigung der Proteine über Affinitätschromatographie und den spezifischen Nachweis mittels anti-His-Tag-Antikörper ermöglicht. Für die Charakterisierung der erzeugten Expressionsplasmide wurden diese in den *E.coli* Stamm K12 DH5a transformiert. Nach der Selektionierung rekombinanter Klone, Überprüfung der korrekten Orientierung und Nukleotidsequenz des Inserts, wurden die Expressionsplasmide in den Expressionsstamm *E.coli* SG13009 retransformiert. Über ein zusätzliches Repressorplasmid (pREP4), welches den *lac*-Repressor konstitutiv überexprimiert,

gewährleistet dieser Stamm eine effiziente Repression des T5-Promotors, indem er eine Synthese der rekombinanten Proteine erst nach Zugabe des Induktors **Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid** (IPTG) zulässt.

4.1.1.3. Nachweis der Synthese prokaryontischer Fusionsproteine

Um zu untersuchen, ob ausgehend von den erzeugten Plasmidkonstrukten rekombinante Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kD synthetisiert werden, wurden 100 ml Induktionskulturen angesetzt und stündlich Proben vor und nach der Zugabe des Induktors bis zum Zeitpunkt der Ernte analysiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einem 10% SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen wurden diese mit dem Proteinfarbstoff Coomassie Blue angefärbt (Abb. 8).

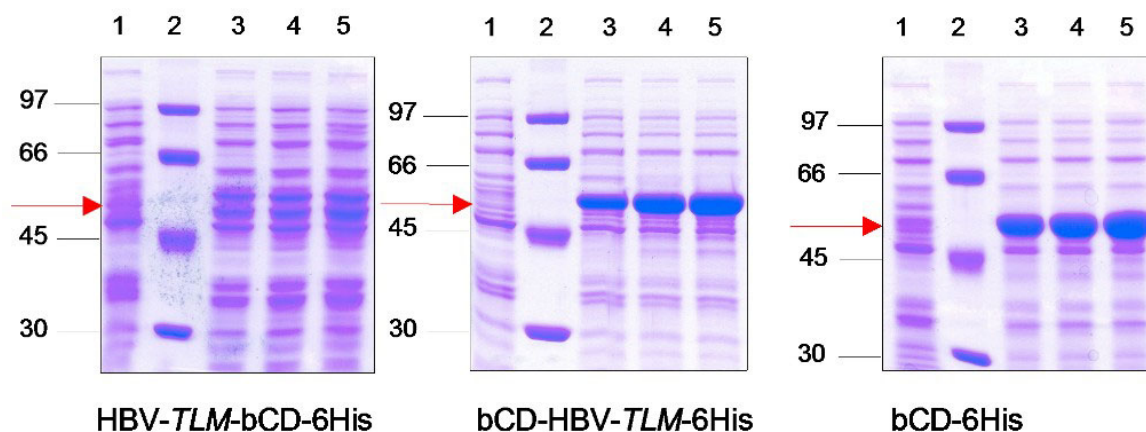


Abb. 8: Nachweis der Synthese prokaryontischer bCD-Fusionsproteine in 100 ml Induktionskulturen mittels SDS-Gel-Analyse

Spur 1 jeweils: vor Induktion

Spur 2 jeweils: LMW-Marker

Spur 3 jeweils: 1 h nach Zugabe von IPTG

Spur 4 jeweils: 2 h nach Zugabe von IPTG

Spur 5 jeweils: 3 h nach Zugabe von IPTG

Abb. 8 zeigt die mit Coomassie blue gefärbten SDS-Gele der pQe60-Expressionskonstrukte vor und nach IPTG-Zugabe. Bei dem Protein bCD-HBV-TLM-6His (Abb. 8 Mitte) und beim Wildtyp-Protein bCD-6His (Abb. 8 rechts) sind bereits 1 h nach Zugabe des Induktors deutliche Proteinbanden in der erwarteten Größe von ca. 50 kD zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um die Fusionsproteine handelt. Die Synthese des Suizidgens mit aminoterminal

proteine handelt. Die Synthese des Suizidgens mit aminoterminal fusioniertem HBV-*TLM* (Abb. 8 links) konnte in der SDS-Gel-Analyse nicht nachgewiesen werden.

In der SDS-Gel-Analyse der pQe8-Expressionsplasmiden mit N-terminal angefügtem 6His-Tag konnte eine Proteinbiosynthese trotz mehrmaliger Induktion bzw. Verwendung verschiedener Klone bei keinem der Fusionsproteine nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

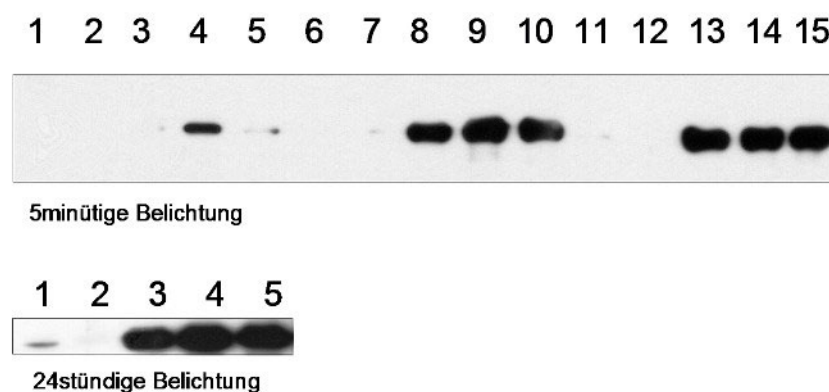


Abb. 9: Nachweis der Synthese prokaryontischer Fusionsproteine in 100ml-Induktionskulturen mittels Western-Blot-Analyse

Die Proben wurden für die Western-Blot-Analyse nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im 10% SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Für die spezifische Detektion wurde ein bCDTLM6His-Antikörper 1:500 und der sekundäre Antikörper (anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody -from donkey- NA934V) 1:2.000 verdünnt eingesetzt.

- Spur 1: SG13009-pQe60-HBV-*TLM*-bCD-6His vor Induktion
- Spur 2: LMW-Marker (ungefärbt)
- Spur 3: SG13009-pQe60-HBV-*TLM*-bCD-6His 1 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 4: SG13009-pQe60-HBV-*TLM*-bCD-6His 2 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 5: SG13009-pQe60-HBV-*TLM*-bCD-6His 3 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 6: SG13009-pQe60-bCD-HBV-*TLM*-6His vor Induktion
- Spur 7: LMW-Marker (ungefärbt)
- Spur 8: SG13009-pQe60-bCD-HBV-*TLM*-6His 1 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 9: SG13009-pQe60-bCD-HBV-*TLM*-6His 2h nach IPTG-Zugabe
- Spur 10: SG13009-pQe60-bCD-HBV-*TLM*-6His 3h nach IPTG-Zugabe
- Spur 11: SG13009-pQe60-bCD-6His vor Induktion
- Spur 12: LMW-Marker (ungefärbt)
- Spur 13: SG13009-pQe60-bCD-6His 1 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 14: SG13009-pQe60-bCD-6His 2 h nach IPTG-Zugabe
- Spur 15: SG13009-pQe60-bCD-6His 3 h nach IPTG-Zugabe

Für den Nachweis, dass es sich bei den, ausgehend von den pQe60-Expressionsplasmiden synthetisierten Proteinen, um die klonierten 6His-

Fusions-proteine handelt bzw. ob das Protein HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His tatsächlich nicht gebildet wird, wurden unter Verwendung eines im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten bCD-spezifischen Antiserums Western-Blot-Analysen der bei -20 °C gelagerten Proben aus den Induktionskulturen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt (Abb. 9).

Bereits 1 h nach Zugabe des Induktors ist in Abb. 9 deutlich eine Proteinsynthese bei den Fusionsproteinen bCD-HBV-*TLM*-6His (Abb. 9 Spur 8) und bCD-6His (Abb. 9 Spur 13) zu erkennen. Aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität konnte mittels Western-Blot-Analyse ebenfalls eine, wenn auch wesentliche geringere Biosynthese des Proteins HBV-*TLM*-bCD-6His (Abb. 9 unten), nachgewiesen werden, die jedoch erst bei längeren Belichtungszeiten deutlich wird. Bei einer verlängerten Filmexposition konnte auch eine geringe Menge bCD-spezifisches Protein (Abb. 9 unten Spur 1) vor der Zugabe von IPTG detektiert werden. Dabei handelt es sich vermutlich um endogene Cytosin Desaminase, die ursprünglich aus *E.coli* stammt.

Insgesamt ließ sich mit der Western-Blot-Analyse die SDS-Gel-Analyse/Coomassie-Färbung aus Abb. 8 proteinspezifisch bestätigen. Danach werden alle drei Fusionsproteine mit C-terminalem 6His-Tag synthetisiert, wobei bei dem Protein mit aminoterminal fusioniertem HBV-*TLM* deutlich weniger gebildet wird. Eine Synthese von Proteinen mit N-terminalem 6His-Tag, auf Grundlage des pQe8-Expressionsplasmids konnte auch in der Western-Blot-Analyse für keines der drei Fusionsproteine nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Die erzeugten pQe8-Expressionsplasmide wurden für die weiteren Versuche daher nicht mehr verwendet.

4.1.1.4. Reinigung prokaryontischer Fusionsproteine

Für die affinitätschromatographische Reinigung der prokaryontischen Fusionsproteine wurden 1 l-Induktionskulturen im Schüttelkolben (SK) bzw. im 1,5 l Fermenter (F) mit geregelter Begasung durchgeführt. Die aus den Induktionskulturen gewonnenen Zellpellets (ca. 5 g Feuchtmasse/l aus SK, ca. 20 g aus F) wurden mit Lysepuffer (6 ml pro g Feuchtmasse) resuspendiert und mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Zur Abtrennung von unaufgeschlossenen Zellen und Debris wurde bei 10.000 x g 15 min zentrifugiert. Die Aufreinigung der

6His-getagten Proteine aus dem geklärten Zelllysat erfolgte über die Metallchelatl-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose, einem Säulenmaterial, das sich durch hohe Bindungskapazität für mehrfach His-getagte Proteine bei gleichzeitiger minimaler Bindung von unspezifischen Proteinen auszeichnet. Da eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Renaturierung zum Verlust der enzymatischen Funktion der Proteine hätte führen können, wurde für die Lyse und die Affinitätschromatographie ein natives, Tris-gepuffertes System gewählt. Für die Prävention eines proteolytischen Abbaus der Proteine wurden den Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt und auf Eis gearbeitet. Das proteinhaltige Zelllysat wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine mit 3 ml Ni-NTA-Agarose gepackte FPLC-Säule geladen. Nach intensivem Waschen erfolgte die fraktionierte Elution der immobilisierten 6His-Fusionsproteine von der Säule mit steigender Imidazolkonzentration. Ein typischer Elutionsverlauf ist exemplarisch für das Fusionsprotein bCD-HBV-TLM-6His in Abb. 10 dargestellt.

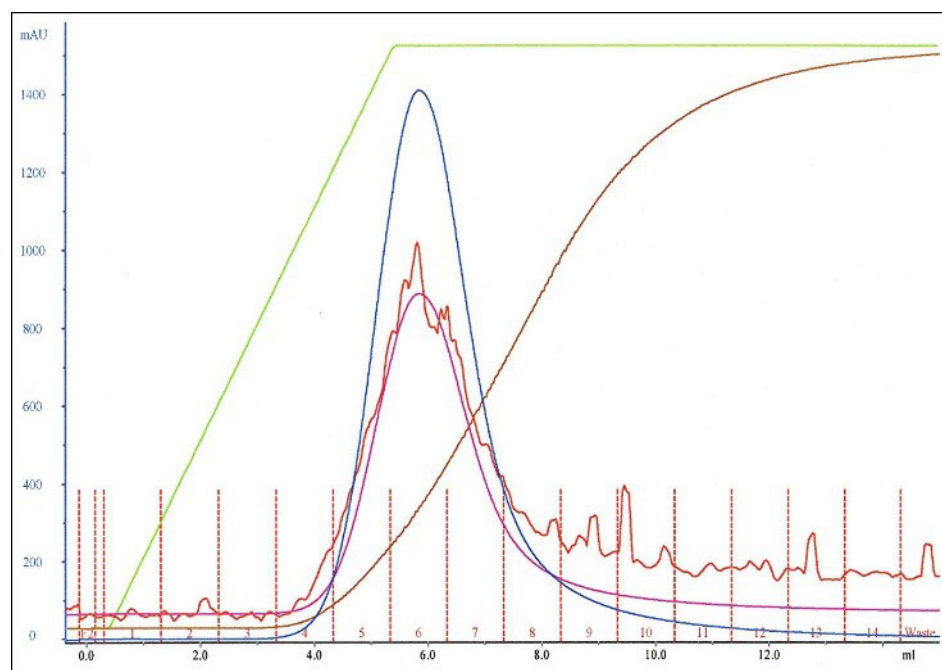


Abb. 10: Fraktionierte Elution des His-getagten Proteins bCD-HBV-TLM-6His von der Ni-NTA-Matrix mit steigender Imidazolkonzentration
30 ml Zelllysat aus einer 1 l-Induktionskultur wurden auf 2 ml Ni-NTA-Agarose mit einem Fluß von 2 ml/min aufgetragen und nach intensivem Waschen mit steigendem Imidazolgradienten in 1 ml-Fractionen eluiert. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm (blau), bei 260 nm (lila) und bei 215 nm (rot) über dem Elutionsvolumen in ml aufgetragen. Grün dargestellt ist der theoretische Gradientenverlauf, braun der Anstieg der Leitfähigkeit.

Die einzelnen *Peak*-Fraktionen aus Abb. 10 wurden in der SDS-Gel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung auf das Vorhandensein von 6His-Fusionsproteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kD überprüft (Abb. 11, exemplarisch dargestellt für das Fusionsprotein bCD-HBV-TLM-6His).

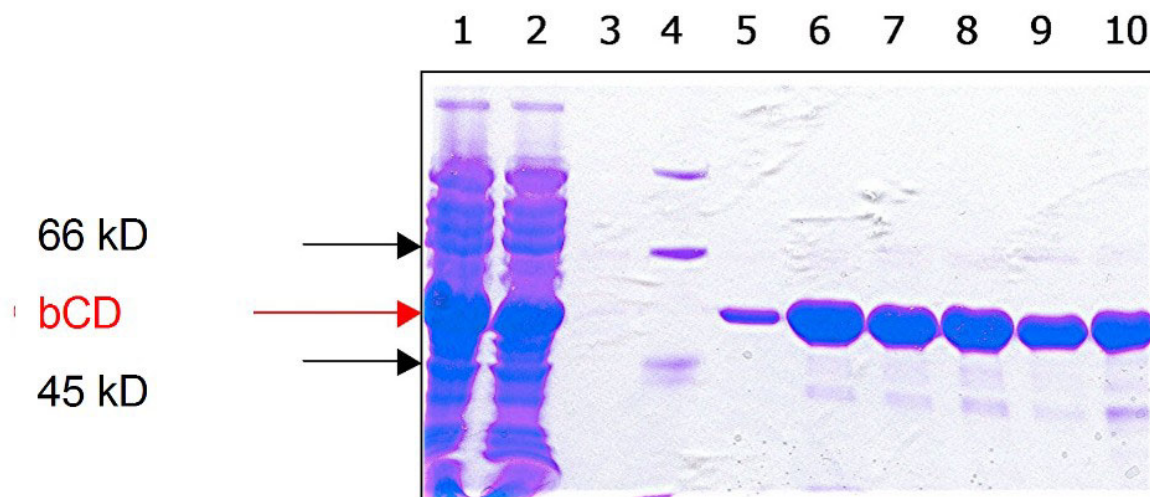


Abb. 11: **SDS-Gel-Analyse der fraktionierten Elution von bCD-HBV-TLM-6His**

Je 20 µl Probe wurden in einem 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

Spur 1: Zelllysat

Spur 2: Durchlauf

Spur 3: Waschen

Spur 4: LMW-Marker

Spur 5-10: Fraktionen 4-9 des Eluats

Spur 1 in Abb. 11 zeigt eine Probe des geklärten Zelllysates vor dem Auftragen auf die Ni-NTA-Säule. Neben einer sehr starken Proteinbande bei ca. 50 kD sind weitere Proteine aus den Bakterienzellen zu erkennen.

In der Spur 2, in der eine Probe aus dem Durchlauf aufgetragen wurde, kann man erkennen, dass das eingesetzte Säulenmaterial mit Proteinen überladen wurde, d.h. nicht alle 6His-Fusionsproteine wurden immobilisiert. Große Mengen Protein befinden sich noch im Durchlauf. Um die gesamte Proteinmenge nutzen zu können, wurde deshalb bei nachfolgenden Reinigungen das Säulenvolumen vergrößert bzw. der Durchlauf bis zu 3 x rechromatographiert.

In Spur 3 wurde eine Probe aus dem Waschschrift aufgetragen. Um schwach oder unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen, enthielt der

Waschpuffer 20 mM Imidazol. Die Analyse der Waschfraktionen bestätigte, dass mit groben Verunreinigungen durch Fremdproteine nicht gerechnet werden muss.

Die Spuren 5-10 zeigen eluierte Proteine mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 50 kD.

Um die Reinheit der Fraktionen beurteilen zu können, wurden die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung zusätzlich silbergefärbt (Abb. 12, exemplarisch dargestellt für das Suizidprotein bCD-HBV-*TLM*-6His). Außer der bCD-spezifischen Proteinbande konnten im silbergefärbten SDS-Gel nur wenige, zusätzlich eluierte Proteine detektiert werden.

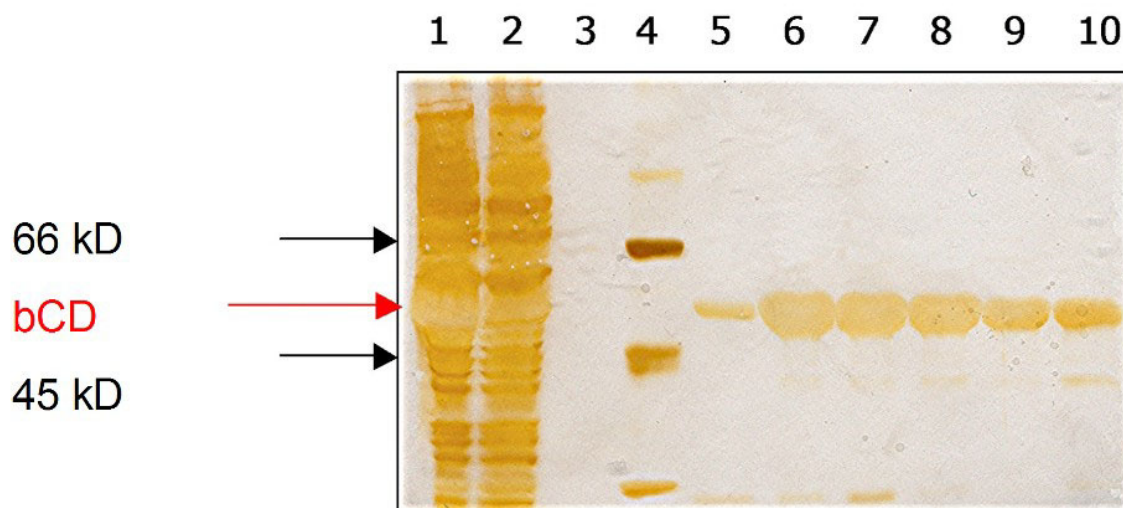


Abb. 12: Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen des affinitäts-gereinigten Proteins bCD-HBV-*TLM*-6His

Je 20 µl Probe wurden in einem 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

Spur 1: Zelllysat

Spur 2: Durchlauf

Spur 3: Waschen

Spur 4: LMW-Marker

Spur 5-10: Fraktionen 4-9 des Eluats

Für die weitere Charakterisierung wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und zweistufig gegen imidazolfreien 50 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,5, dialysiert. Die Lagerung der sterilfiltrierten Proteinlösungen erfolgte bei 4 °C.

Aus einer 1 l Induktionskultur konnten bei einstufiger Chromatographie bis zu 3 mg aus einer 1,5 l-Fermentation die 4fache Menge bCD-HBV-*TLM*-6His und

bCD-6His mit einer Reinheit von ca. 95% gewonnen werden. Bei dem Fusionsprotein mit N-terminalem HBV-*TLM* wurden Ausbeuten von ca. 2 mg aus 2 l Induktionskultur erreicht.

4.1.1.5. Herstellung von polyklonalen bCD-spezifischen Antikörpern

Ein kommerziell erhältlicher Antikörper für einen spezifischen Proteinnachweis der bCD-Fusionsproteine stand zu Beginn der Arbeiten nicht zur Verfügung. Deshalb wurden für die Gewinnung eines polyklonalen Antiserums für Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzfärbungen und intrazelluläre Markierungen, Kaninchen mit je 100 µg affinitätsgereinigtem Protein bCD-HBV-*TLM*-6His, dessen Identität als bCD im enzymatischen Test bereits nachgewiesen wurde, immunisiert und im Abstand von 2-3 Wochen 2 x geboostert. Das gewonnene polyklonale Antiserum wurde anschließend auf seine Eignung zum Nachweis der bCD-spezifischen Proteine in der Western-Blot-Analyse untersucht. Dazu wurde gereinigtes Antigen bCD-HBV-*TLM*-6His in verschiedenen Konzentrationen in Gesamtzelllysate von Hepatomzellen gemischt. Die Proteingemische wurden in einem 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem gewonnenen Antiserum in einer Verdünnung von 1:2.000 und einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000, der gegen Kaninchen IgG gerichtet war, analysiert (Abb. 14).

Die linke Bildhälfte dieser Abbildung zeigt, dass in der Western-Blot-Analyse, neben einer für das Antigen postulierten Bande bei ca. 50 kD, weitere Banden detektiert wurden, die auf eine Degradation des Antigens oder unspezifisch detektierte Proteine schließen lassen. Da das ungereinigte Antiserum aufgrund des nachgewiesenen Bandenmusters eine eindeutige Zuordnung der bCD-Bande nicht ermöglicht, erwies es sich für Western-Blot-Analysen somit als ungeeignet. Um eine Verbesserung der Spezifität zu erreichen, wurden bCD-spezifische Antikörper affinitätschromatographisch aus dem Antiserum gereinigt. Über die im Antigen enthaltenen primären Amine wurde das für die Immunisierung verwendete Protein bCD-HBV-*TLM*-6His an NHS (**N-Hydroxysuccinimid**)-aktivierte

Sepharose gekoppelt. Die erzeugte bCD-HBV-*TLM*-6His-Sepharose wurde in eine FPLC-Säule gefüllt, auf die das Antiserum mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen wurde. Die im Antiserum enthaltenen bCD-HBV-*TLM*-6His spezifischen Antikörper wurden durch die Bindung an das Antigen an der Säule retiniert. Nach intensivem Waschen erfolgte die saure Elution der isolierten Antikörper (Abb. 13).

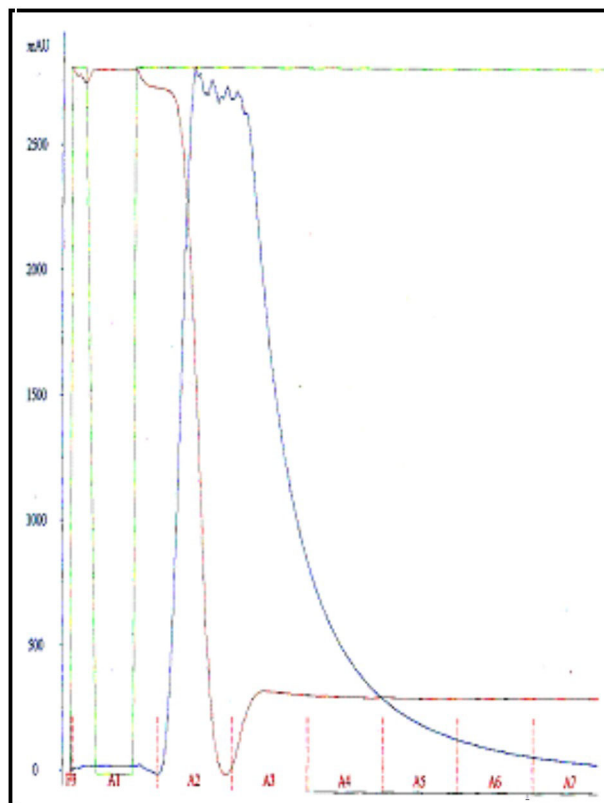


Abb. 13: Saure Elution bCD-spezifischer Antikörper aus Kaninchenserum nach Immobilisierung an eine Antigen-gekoppelte Sepharose

10 ml Antiserum wurden mit einem Fluss von 1 ml/min auf eine 1 ml bCD-HBV-*TLM*-6His-Sepharose-Säule geladen und nach intensivem Waschen in 1 ml Fraktionen eluiert. Im Chromatogramm wurde die Absorption bei 280 nm (blau) über dem Elutionsvolumen in ml dargestellt. Zusätzlich sind die Leitfähigkeit (braun) und die Konzentration an Elutionspuffer (grün) dargestellt.

Die proteinhaltigen Fraktionen A2-A4 in Abb. 13 wurden vereinigt. Die Antikörperlösung wurde sofort in einen physiologischen pH-Bereich neutralisiert und zweistufig gegen PBS dialysiert. Die Antikörperlösung wurde mit Glycerol und Natriumazid versetzt und portioniert bei -70 °C eingefroren.

Die Sensitivität und die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörperlösung wurde erneut in der Western-Blot-Analyse (Abb. 14, b) untersucht.

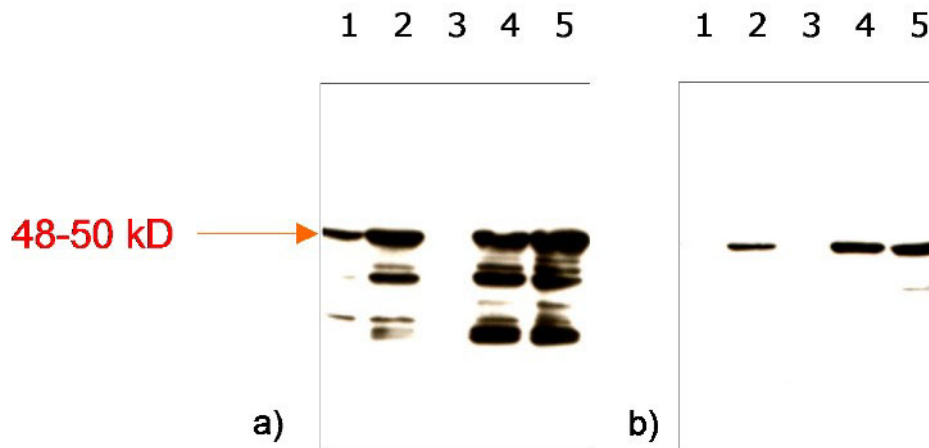


Abb. 14: Sensitivität und Spezifität des Antiserums (a) im Vergleich zur affinitätsgereinigten Antikörperlösung (b)

(dargestellt ist die 2. Aufreinigung, die für die eukaryontischen Experimente verwendet wurde).

Jeweils 1 ng (Spur 1), 10 ng (Spur 2), 50 ng (Spur 4) und 100 ng (Spur 5) Antigen wurden in 20 µl Gesamtzelllysat von Hepatomzellen gemischt und in einem 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der bCD-spezifische Nachweis mit Antiserum 1:2.000 verdünnt (a) und mit affinitätsgereinigten Antikörpern 1:500 verdünnt (b). In der jeweils mittleren Spur wurde ungefärbter LMW-Marker (Spur 3) aufgetragen. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey), NA934V 1:2.000 verdünnt eingesetzt.

Die rechte Bildhälfte zeigt, dass mit der affinitätsgereinigten Antikörperlösung in einer Verdünnung von 1:500 eine Proteinmenge von 10 ng in der Western-Blot-Analyse spezifisch detektiert werden kann. Bei einer Antigenmenge von 1 ng Protein wird bei einer Verdünnung von 1:500 die Detektionsgrenze der Antikörperlösung erreicht und das Antigen wird nicht erkannt. Die mit dem Antiserum detektierten Degradationsprodukte wurden von den aufgereinigten Antikörpern nicht mehr detektiert, obwohl diese höher konzentriert eingesetzt wurden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Antikörper aufgereinigt wurden, die einerseits spezifisch das *full length*-Protein erkennen, andererseits jedoch eine geringere Sensitivität gegenüber dem Antigen aufweisen.

Für die folgenden Versuche wurde die Antikörperlösung als bCDTLM6His-Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 bis 1:500 in der Western-Blot-Analyse eingesetzt, da sie im Vergleich zum Antiserum eine eindeutige Zuordnung bCD-spezifischer Proteine ermöglicht.

Um die gereinigte Antikörperlösung auf ihre Eignung für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung und die FACS-Analyse nach intrazellulärer Markierung zu testen, wurden Hepatom(HepG2)-Zellen mittels Lipofektion transient mit dem eukaryontischen Expressionsplasmid pcDNA3-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His transfiziert. Nach indirekter Fluoreszenzfärbung der Zellen mit den affinitätsgeinigten Antikörpern wurden die Zellen mikroskopisch auf das Vorhandensein von bCD-spezifischen Proteinen untersucht.

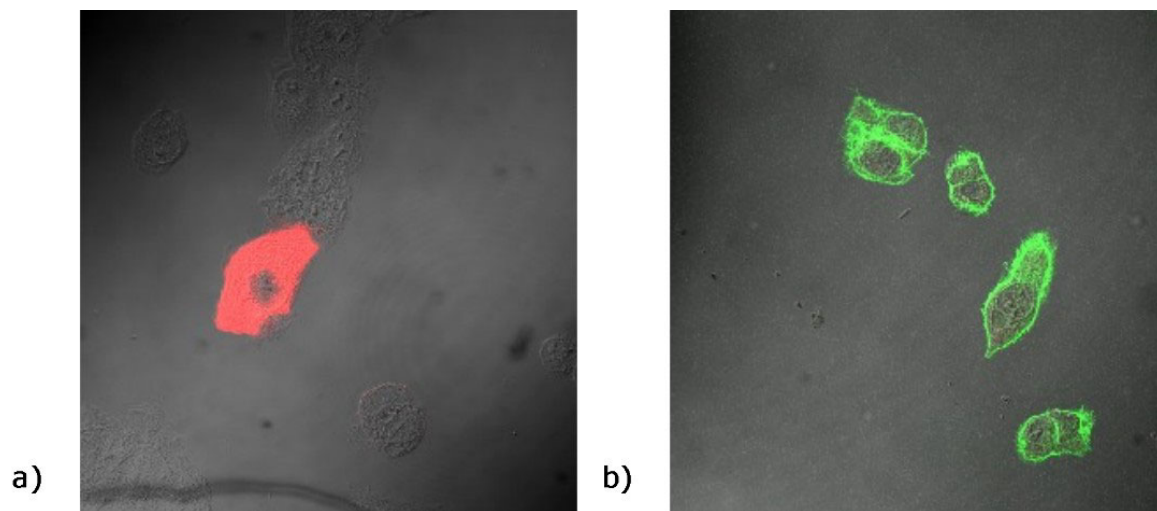


Abb. 15: Spezifität des bCDTLM6His-Antikörpers in der Immunfluoreszenzfärbung

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion auf Deckgläschen ausgelegt und nach weiteren 24 h 10 min mit eiskaltem Ethanol fixiert (a). Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit dem bCDTLM6His-Antikörper, der 1:100 in Blockierungslösung verdünnt wurde. Für die Visualisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop (C-Apochromat-Objektiv 63x/1.2 W corr.) wurde ein gegen Kaninchen gerichteter, Cy^{TM3}-konjugierter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Um die nicht angefärbten, untransfizierten Kontrollzellen (b) sichtbar zu machen, wurden diese zusätzlich mit Phalloidin-FITC (Endkonzentration 0,13 µg/ml) gefärbt, welches spezifisch an das Zytoskelett der Zellen bindet.

Die in Abb. 15 a dargestellte Immunfluoreszenz transient transfizierter Hepatomzellen zeigt, dass der Antikörper in der gewählten Verdünnung von 1:100 eine Visualisierung bCD-spezifischer Proteine in Hepatomzellen nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht. Nicht transfizierte Kontrollzellen wurden dagegen nicht bCD-spezifisch angefärbt (Abb. 15 b).

Wie die FACS-Analysen transient transfizierter Hepatomzellen in Abb. 16 zeigen,

sind der Primär- und der Sekundärantikörper in den gewählten Verdünnungsstufen (Primärantikörper 1:100 und Sekundärantikörper 1:300) gut für die intrazelluläre Markierung der Fusionsproteine geeignet. In keiner der ausgetesteten Verdünnungsstufen des Primärantikörpers (1:25, 1:50 und 1:100) kam es zu einer detektierbaren, unspezifischen Anfärbung der parentalen Hepatomzellen (nicht dargestellt). Für weitere intrazelluläre Markierungen wurde eine Verdünnung des Primärantikörpers von 1:100 festgelegt.

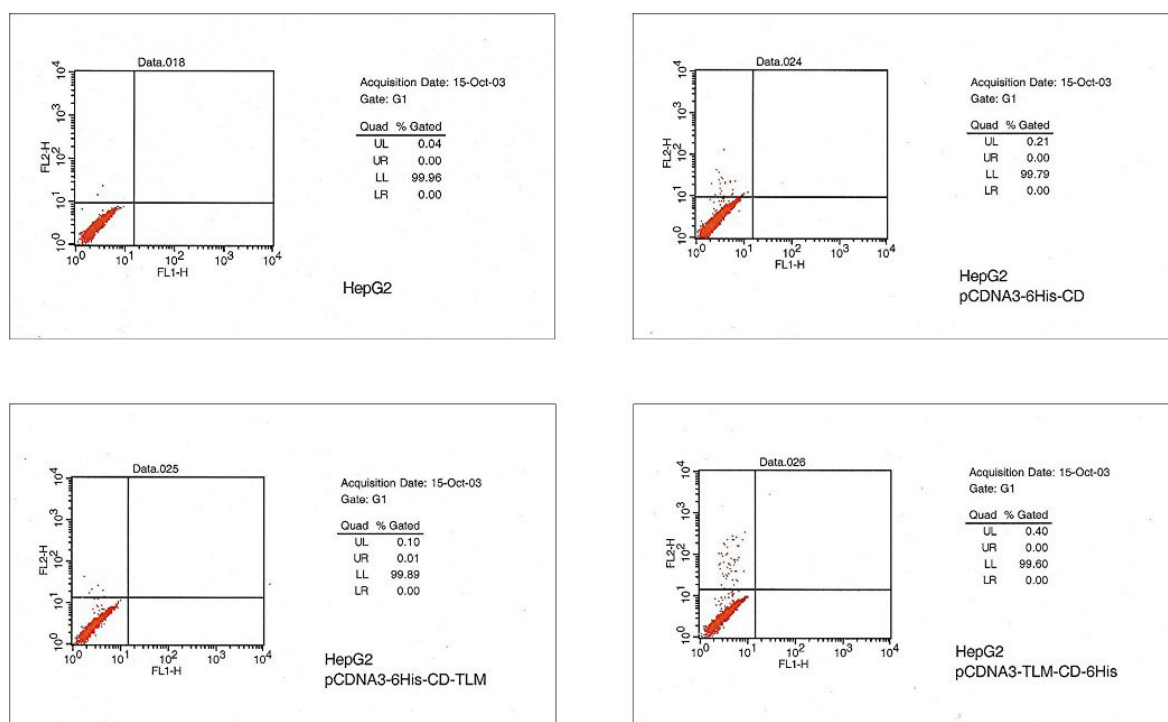


Abb. 16: FACS-Analyse von transient transfizierten, intrazellulär markierten Hepatomzellen

Um die Eignung der aufgereinigten Antikörper für eine intrazelluläre Markierung von Fusionsproteinen für die FACS-Analyse überprüfen zu können, wurden die transient transfizierten Zellen 48 h nach Transfektion tryptisiert und nach Waschen mit PBS-Puffer mit 2% Formaldehydlösung 20 min bei RT fixiert. Die mit detergentzhaltigem Puffer permeabilisierten Zellen wurden für die Markierung mit 50 μ l bCDTLM6His-Antikörper-Lösung 1:100 verdünnt in Permeabilisierungspuffer, resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurde der gegen Kaninchen gerichtete, CyTM₃-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt, dessen Konzentration (1:300) zuvor ausgetestet wurde. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte mit einem FACSCalibur-Gerät und die Auswertung mit dem Programm CellQuest.

Dot Plot FL1-H: 525 nm/ FL2-H: 570nm

Auffällig bei den Ansätzen zur intrazellulären Markierung war, dass nach transienter Transfektion der Hepatomzellen mit eukaryontischen Expressionsplasmidi-

den insgesamt sehr wenig markierte Proteine detektiert werden konnten. Die sowohl mittels Immunfluoreszenz als auch mit der FACS-Analyse nachgewiesenen Mengen lagen weit unter den erwarteten Proteinmengen, gemessen an der mikroskopisch bestimmten Transfektionseffizienz von ca. 15% bei Transfektion der Hepatomzellen mit dem Kontrollplasmid pEGFPN-1.

Mit der Generierung der affinitätsgereinigten Antikörper stand für die Durchführung der Versuche ein bCD-spezifischer Antikörper zur Verfügung, der sowohl in der Western-Blot-Analyse als auch für intrazelluläre Markierungen mit anschließender Immunfluoreszenzmikroskopie oder FACS-Analyse zu verwenden ist.

4.1.2. Proteinchemische und funktionelle Charakterisierung prokaryontischer Fusionsproteine

4.1.2.1. Bestimmung des Molekulargewichtes und des Oligomerisierungszustandes

Eine Grundvoraussetzung für die enzymatische Aktivität der bakteriellen Cytosin Desaminase ist ihr Vorliegen als Hexamer. Für die Bildung des Hexamers dimerisieren zunächst zwei bCD-Monomere. Drei dieser Dimere schließen sich dann zu einem Hexamer zusammen. Für die Untersuchung, ob die mit dem HBV-*TLM* fusionierten Suizidproteine nach der Synthese und der Aufreinigung in der bCD-typischen Struktur als Hexamer vorliegen und damit die strukturelle Voraussetzung für eine enzymatische Aktivität gegeben ist oder ob das HBV-*TLM* bzw. der 6His-Tag eine Dimerisierung, z.B. durch Maskierung der Dimerisierungsstellen oder durch strukturelle Wechselwirkungen, verhindert, wurde das Molekulargewicht bzw. der Oligomerisierungszustand der Fusionsproteine über eine Größenausschluss-Chromatographie bestimmt. Für die Versuche wurde eine analytische Superose 6-FPLC-Säule 10/30 verwendet, die Proteingemische in einem Molekulargewichtsbereich von 5.000 bis 5×10^6 kD auftrennen kann. Als Laufmittel wurde PBS-Puffer gewählt. Da ein spezifisches Referenzprotein nicht zur Verfügung stand, wurden für die Ermittlung einer Standardkurve für das Molekulargewicht die Proteine Thyreoglobulin mit einer Größe von 669 kD, Ferritin mit 440 kD und Aldolase mit 158 kD verwendet. Je 100 µl affinitätsgereinigtes, filtrier-

tes, prokaryontisches Fusionsprotein wurden analysiert. Die Chromatogramme für die Standard- und die Fusionsproteine wurden in einer Darstellung zusammengefasst und sind in Abb. 17 dargestellt.

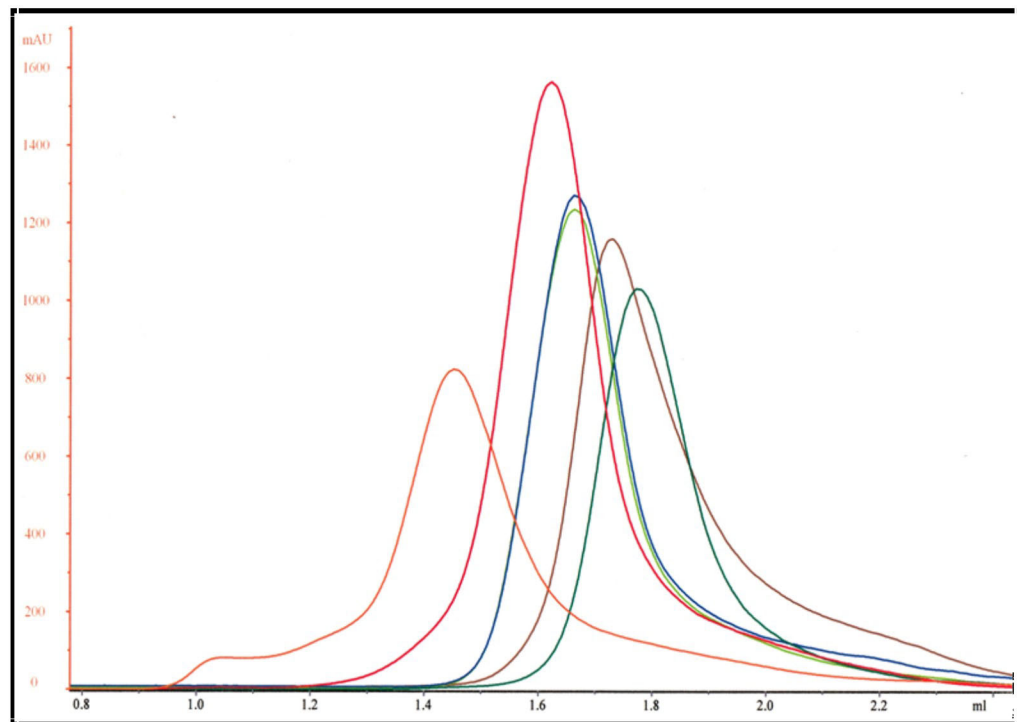


Abb. 17: Bestimmung der Molekulargewichte der Standard- und der Fusionsproteine

Größenausschlusschromatographie; Säule: Superose 6 10/30, Fluss: 0,5 ml/min, Laufmittel: PBS-Puffer, Probenvolumen: 100 µl, Flussrate von 0,5 ml/min x-Achse: Elutionsvolumen in ml, Y-Achse: Absorption bei 280 nm in mAU; Standardproteine (je 1 mg/ml, Ferritin 10 mg/ml) : Thyreoglobulin (orange), Ferritin (rot), und Aldolase (dunkelgrün), Fusionsproteine: HBV-*TLM*-bCD-6His (blau), bCD-HBV-*TLM*-6His (hellgrün) und bCD-6His (braun)

Trägt man die aus Abb. 17 für die Standardproteine ermittelten Elutionsvolumen über den logarithmischen Molekulargewichten auf, so lassen sich aus der sigmoiden Standardkurve über die ermittelten Elutionsvolumen für die Fusionsproteine die dazugehörigen Molekulargewichte ableiten. Nach der Bestimmung des Molekulargewichtes kann so bei bekannter Größe eines Monomers der Oligomerisierungszustand der Proteine ermittelt werden. Unter Verwendung der für die Fusionsproteine bestimmten Elutionsvolumen ergaben sich für die Proteine HBV-*TLM*-bCD-6His und bCD-HBV-*TLM*-6His ein Molekulargewicht von ca. 300 kD und für das wt-Protein bCD-6His von ca. 290 kD. Da sich rechnerisch bei einer Mo-

nomergröße von ca. 50 kD ein Molekulargewicht für ein Hexamer von ca. 300 kD ergibt, konnte so für alle drei Fusionsproteine eine Hexamerisierung nachgewiesen werden. Bedingt durch das Fehlen des HBV-*TLM* beim wt-Protein bCD-6His wies das dazugehörige Hexamer erwartungsgemäß ein etwas kleineres Molekulargewicht auf als die Hexamere der beiden HBV-*TLM*-Fusionsproteine. Da alle Proteine als ein einzelner *Peak* eluiert wurden, konnte von einer vollständigen Hexamerisierung der Proteine nach der Synthese und Aufreinigung ausgegangen werden. Die strukturellen Voraussetzungen für eine enzymatische Aktivität als bakterielle Cytosin Desaminase wurden somit für alle Fusionsproteine nachgewiesen.

4.1.2.2. Photometrischer Test zur Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität der prokaryontischen Fusionsproteine

Für eine schnelle Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität der Fusionsproteine als Maß für ihre enzymatische Funktionalität, z.B. nach sich oft wiederholenden Proteinaufreinigungen, wurde ein unkomplizierter, schnell durchzuführender Test benötigt. Besonders geeignet für solche Anwendungen sind photometrische Messungen, mit welchen enzymkatalysierte Reaktionen verfolgt werden können, bei denen es während des Reaktionsverlaufes kontinuierlich zu Veränderungen der Eigenschaften von Substraten oder Produkten kommt. In solchen kontinuierlichen Tests können kinetische Parameter, wie z.B. die lineare Abnahme der Lichtabsorption mit der Zeit relativ einfach photometrisch gemessen werden. Für die Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität der prokaryontischen Fusionsproteine wurde die Veränderung der Lichtabsorption bei der Desaminierung von Cytosin zu Uracil gemessen. Für die photometrische Messung wurde 1 ml einer 0,5 mM Cytosin-Lösung in einer 0,05 M Tris-Cl-Lösung mit einem pH von 7,5 in einer Quarzglasküvette vorgelegt und bei 286 nm als Nullwert abgeglichen. Jeweils 10 µl einer 2 µM Proteinlösung wurden zugesetzt und der Ansatz kurz durchmischt. Die Veränderung der Lichtabsorption wurde über 180 s kontinuierlich alle s bei 286 nm gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 18).

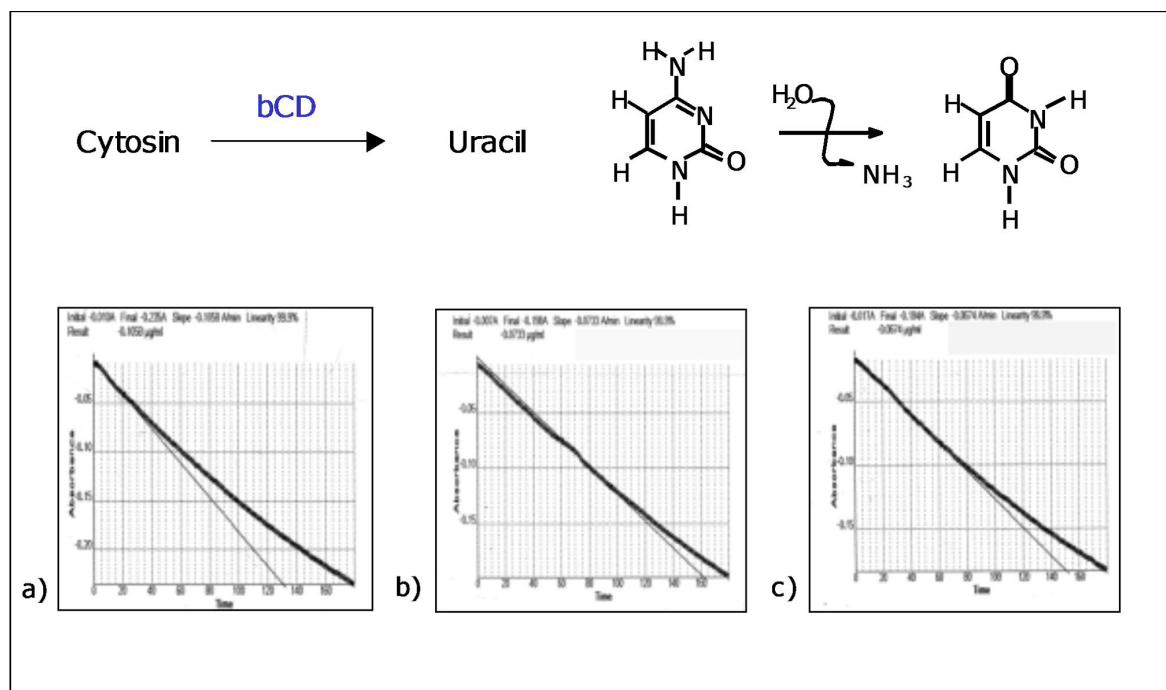


Abb. 18: Bestimmung der enzymatischen Aktivität prokaryontischer Fusionsproteine mittels Absorptionsspektrometrie bei 286 nm

Für die Messung der Lichtabsorption während der Umsetzung von Cytosin zu Uracil wurden 1 ml 0,5 mM Cytosin in Tris-Cl, pH 7,5 versetzt mit 10 µl 2 µM Protein und die Absorption kontinuierlich jede Sekunde gemessen. Auf der x-Achse wurde die Zeit und auf der y-Achse die Absorption bei 286 nm aufgetragen.

links HBV-TLM-bCD-6His, Mitte bCD-HBV-TLM-6His, rechts bCD-6His

Für die Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität der bCD wurde die Abnahme der Lichtabsorption mit der Zeit $\Delta A/t$ aus der Anfangssteigung im linearen Bereich bei der Auftragung von Absorption gegen die Zeit (Abb. 18) bestimmt. Für die Änderung des molaren spektralen Absorptionskoeffizient $\Delta \epsilon$ während der Desaminierung wurde der von Porter & Austin, 1993 ermittelte Wert von $-0,68 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet. Die Konzentration c der eingesetzten Proteinlösung wurde über die Messung der Lichtabsorption der Enzymlösung bei 279 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, wobei als molarer spektraler Absorptionskoeffizient für die bCD ein Wert von $\epsilon = 0,076 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Porter & Austin, 1993) verwendet wurde. Die spezifische Aktivität lässt sich nach Umwandlung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit den ermittelten Größen wie folgt berechnen:

$$\text{spezifische Aktivität } [U / mg] = \frac{\Delta c}{\Delta t * c} = \frac{\Delta A * V}{\varepsilon * d * v * t * c}$$

ΔA = gemessene Absorptionsänderung

t = Zeit in min

V = Gesamtvolumen in ml

d = Schichtdicke der Küvette in cm

v = Probevolumen

ε = molarer spektraler Absorptionskoeffizient $(\text{mol/l})^{-1} * \text{cm}^{-1}$

Dabei entspricht eine spezifische Enzymeinheit bCD derjenigen Enzymmenge, welche die Bildung von einem Mikromol Produkt pro Minute unter definierten Bedingungen katalysiert.

Mit der Einführung des photometrischen Testes konnte erstmals eine enzymatische Funktionalität für alle drei prokaryontischen Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die hierbei ermittelten spezifischen Enzymaktivitäten lagen in der Regel zwischen ca. 80-90 U/mg, wobei Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinaufreinigungen zu beobachten waren. Nach seiner Etablierung wurde der photometrische Test standardmäßig für die Beurteilung der Funktionalität der Proteine nach affinitätschromatographischen Proteinreinigungen eingesetzt.

4.1.2.3. Etablierung eines Nachweises zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von bCD-Fusionsproteinen über Reversed Phase Chromatographie

Als eine weitere Methode für die Bestimmung der Enzymaktivität der verschiedenen Fusionsproteine wurde ein diskontinuierliches Verfahren für die Detektion der Abnahme des Enzymsubstrats Cytosin und der Bildung des Produktes Uracil über die HPLC etabliert.

Diskontinuierliche Verfahren werden bei Enzymreaktionen eingesetzt, die nach einer bestimmten Zeit terminiert werden müssen, um eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Enzymproben zu gewährleisten. Dabei ist darauf zu achten, dass das zur Termination der Reaktion gewählte Verfahren (z.B. Zusatz von Enzyminhibitoren) die Enzymreaktion sofort und dauerhaft beendet und dass die

Messgröße (Substrat- oder Produktkonzentration) unter diesen Bedingungen bis zum Ende der Messung stabil bleibt.

Der Nachweis der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch die verschiedenen Fusionsproteine sollte über eine Reversed Phase (RP)-Chromatographie erfolgen. Für die Festlegung der Detektionswellenlängen wurden Wellenlängenscans für Cytosin und Uracil durchgeführt und die Wellenlängen auf 254, 267 und 274 nm festgelegt. Ausgewählt für die Trennung wurde eine analytische C18 RP-Säule der Fa. Knauer, als isokratisches Laufmittel wurde 0,5 M Natriumacetat/Wasser pH 4,6 verwendet. Um die Eignung der Säule für die Trennung von Substrat und Produkt zu überprüfen, wurden als Standard je 0,5 mM Cytosin und 0,5 mM Uracil in 50 mM Tris-Cl pH 7,5 gemischt und 10 µl der Standardlösung bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die äquilibrierte C18-Säule aufgetragen. Die isokratische Trennung der beiden Standards ist in Abb. 19 dargestellt.

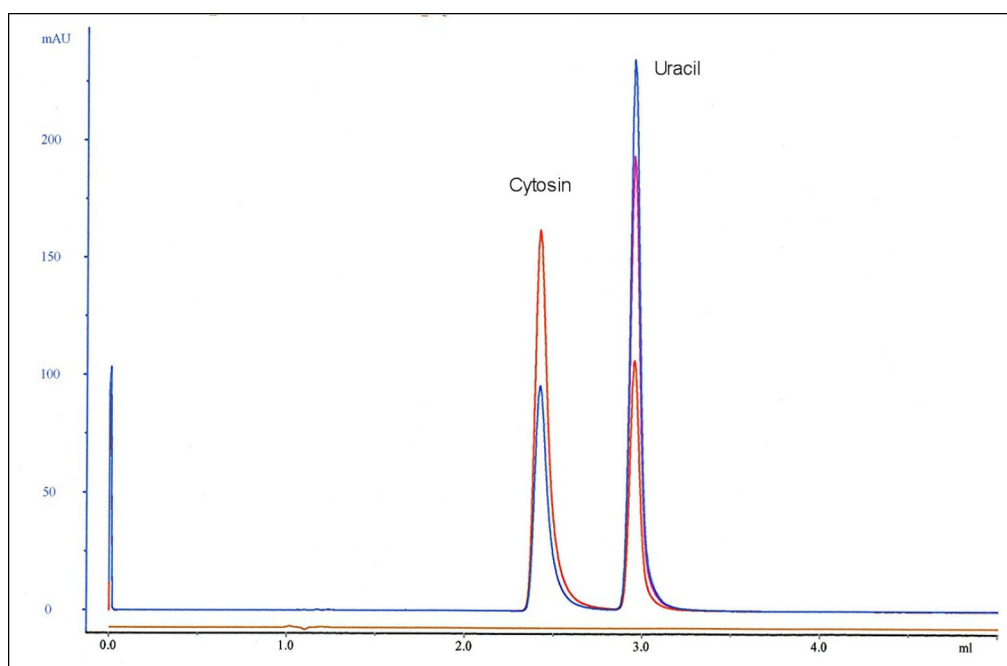


Abb. 19: rp-chromatographische Trennung von Cytosin und Uracil

Je 10 µl 0,5 mM Cytosin und 0,5 mM Uracil gelöst in Tris-Cl, pH 7,5 wurden gemischt und mit einem Fluss von 0,5 ml/min auf eine RP C18-Chromatographiesäule der Fa. Knauer geladen. Die isokratische Trennung erfolgte mit 50 mM Na-Acetat, pH 4,6 als Laufmittel. Im Chromatogramm wurde die Absorption (blau 254 nm, lila 267 nm, rot 274 nm) in mAU über dem Elutionsvolumen in ml aufgezeichnet. Braun dargestellt wurde die Leitfähigkeit.

Sichtbar ist in Abb. 19, dass mit der verwendeten rp-Säule und dem ausgewählten Laufmittel eine sehr gute Trennung der beiden Standardsubstanzen erreicht werden konnte. Durch das in RP-Läufen der Einzelsubstanzen ermittelte charakteristische Elutionsvolumen für Cytosin von 2,42 ml und für Uracil von 2,95 ml sowie über das charakteristische Absorptionsverhalten bei den verschiedenen Wellenlängen konnte eine Zuordnung der Peaks in Abb. 19 vorgenommen werden. Bei dem ersten Peak handelte es sich um Cytosin gefolgt von Uracil.

Für den Nachweis einer enzymatischen Umwandlung von Cytosin zu Uracil durch die prokaryontischen Fusionsproteine wurden je 10 µl einer in der Konzentration abgeglichenen Proteinlösung in 1 ml einer 0,5 mM Cytosinlösung in 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 gemischt und bei RT inkubiert. Nach 1 min erfolgte die Termination der Reaktionen mit 2 mM EDTA-Lösung. Dabei entfernt der Chelatbildner EDTA das für die Aktivität essentielle Metallion aus dem aktiven Zentrum des Holoenzym und es entsteht das inaktive Apoenzym. Je 10 µl des terminierten Reaktionsansatzes wurden nachfolgend über die RP C18-Säule analysiert.

In vergleichenden Ansätzen von Enzympräparationen der prokaryontischen Fusionsproteine konnte eine enzymatische Aktivität bei allen drei Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 20).

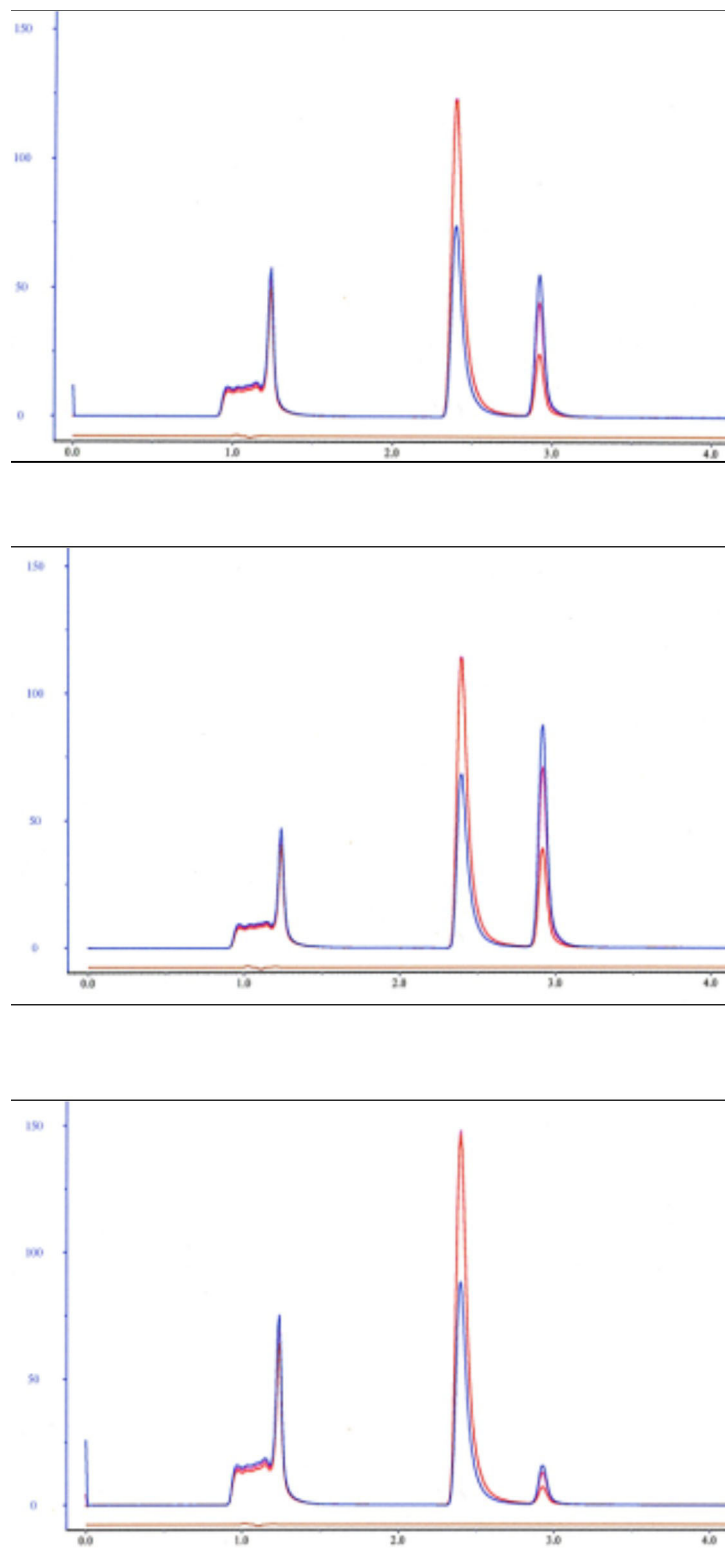


Abb. 20: Umsetzung von Cytosin zu Uracil, katalysiert durch prokaryontische Fusionsproteine

Analysiert wurden je 10µl Reaktionsansatz. Für die Umsetzung wurden je 1ml 0,5mM Cytosin in Tris-Cl, pH 7,5 mit 10µl 0,2µM Protein versetzt, 1min bei RT inkubiert und durch Zusatz von 2 mM EDTA abgestoppt. oben HBV-TLM-bCD-6His, mitte bCD-HBV-TLM-6His, unten bCD-6His. In dem Chromatogramm wurde die Absorption (blau 254nm, lila 267nm, rot 274nm) in mAU wurde über dem Elutionsvolumen in ml aufgezeichnet.

Eine Quantifizierung des enzymkatalysierten Substratumsatzes bzw. der Produktbildung war durch Integration der Peaks bei den durch den Standardlauf bestimmten Elutionsvolumen möglich. Dabei konnten im Unterschied zum photometrischen Enzymtest Unterschiede in der enzymatischen Aktivität der Fusionsproteine festgestellt werden, die auf eine deutlich höhere Sensitivität des Testsystems schließen lassen. Die festgestellten Unterschiede (Abb. 20) in der Aktivität der Fusionsproteine waren jedoch nicht reproduzierbar und variierten in Abhängigkeit von den verschiedenen Induktionskulturen/Reinigungen bzw. der Lagerung der Proteine. Aussagen wurden daher nur hinsichtlich einer grundsätzlich vorhandenen enzymatischen Aktivität und Funktionalität als bCD-spezifisches Enzym getroffen.

4.1.3. Nachweis der Zellpermeabilität prokaryontischer Fusionsproteine

4.1.3.1. Western-Blot-Analyse subzellulärer Fraktionen nach differentieller Zentrifugation zum Nachweis der Translokation

Um zu untersuchen, ob die mit HBV-*TLM* fusionierten Proteine die Fähigkeit besitzen, Zellmembranen zu überwinden, wurden Internalisierungsexperimente durchgeführt.

Die Auftrennung der Zelllysate von Hepatomzellen, die mit proteinhaltigem Medium inkubiert wurden, erfolgte mittels differentieller Zentrifugation in die subzellulären Zellfraktionen Endosomen/Lysosomen, Mikrosomen und Cytosol. Anhand des mittels Bradford bestimmten Proteingehaltes der cytosolischen Fraktionen erfolgte der Konzentrationsabgleich der Proben innerhalb der jeweiligen Fraktionen durch Zusatz von Homogenisationspuffer. Die subzellulären Fraktionen wurden anschließend auf das Vorhandensein von internalisierten Fusionsproteinen in der Western-Blot-Analyse mit rabbit antiCDHBVTLM6His-Antikörper untersucht (Abb. 21).

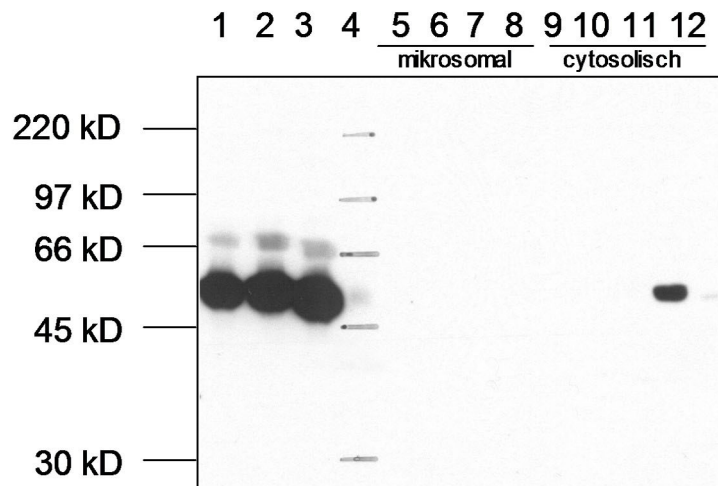


Abb. 21: Nachweis der Internalisierung zellpermeabler Fusionsproteine in Hepatom(HepG2)-Zellen mittels Western-Blot-Analyse subzellulärer Fraktionen

Hepatom(HepG2)-Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgelegt und nach 24 h für 30 min mit Medium, das je 2 μ M Fusionsprotein enthielt, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen im Inkubationsmedium abgeschabt und pelletiert. Nach 2 x Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen in Homogenisationspuffer resuspendiert und im Douncer-Potter mit 25 Hüben aufgeschlossen. Nachfolgend wurden die Lysate mittels differentieller Zentrifugation in die subzellulären Fraktionen Endosomen/Lysosomen, Mikrosomen und Cytosol aufgetrennt und je 25 μ l im 10% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis translokalisierter Proteine erfolgte nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem bCDTLM6His-Antikörper, 1:500 verdünnt und einem anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey NA934V), 1:2.000 verdünnt. Dargestellt sind hier das proteinhaltige Kultivierungsmedium (1-3), die mikrosomalen Fraktionen (5-8) sowie die cytosolische Fraktion (9-12). Spur 1: 2 μ M HBV-*TLM*-bCD-6His, Spur 2: 2 μ M bCD-HBV-*TLM*-6His, Spur 3: 2 μ M bCD-6His, Spur 4: ungefärbter LMW-Marker (angezeichnet), Spur 5: HepG2-Zellen, Spur 6: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M HBV-*TLM*-bCD-6His, Spur 7: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M bCD-HBV-*TLM*-6His, Spur 8: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M bCD-6His, Spur 9: HepG2-Zellen, Spur 10: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M HBV-*TLM*-bCD-6His, Spur 11: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M bCD- HBV-*TLM*-6His, Spur 12: HepG2-Zellen, inkubiert mit 2 μ M bCD-6His

In den endosomalen (nicht dargestellt) und mikrosomalen Fraktionen der mit proteinhaltigem Medium inkubierten Hepatomzellen konnten keine translokalisierten Fusionsproteine mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ausschließlich in der cytosolischen Fraktion der Hepatomzellen, welche mit 2 μ M

bCD-HBV-*TLM*-6His inkubiert worden sind (Abb. 21, Spur 11), konnte bCD-spezifisches Protein signifikant detektiert werden. Auch im Cytosol von Hepatomzellen, die mit wt-Protein inkubiert wurden, fand sich eine schwach detektierbare, bCD-spezifische Proteinbande (Abb. 21, Spur 12), die auf eine geringfügige Aufnahme der wt-bCD in die Tumorzellen hindeutete.

In Zellen, die mit dem Fusionsprotein HBV-*TLM*-bCD-6His inkubiert wurden, konnte dagegen in keiner der analysierten Zellfraktionen (Abb. 21, Spur 6 und 10) translokalisiertes Fusionsprotein nachgewiesen werden. Offensichtlich führte das aminoterminal fusionierte HBV-*TLM* bei dem prokaryontisch synthetisierten Protein nicht zu einer Verstärkung der Zellpermeabilität des Fusionsproteins.

4.1.3.2. Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der Internalisierung und Lokalisation von zellpermeablem Fusionsprotein bCD-HBV-*TLM*-6His in Hepatomzellen

Für die Bestätigung einer durch das HBV-*TLM* vermittelten Membrangängigkeit des Fusionsproteins bCD-HBV-*TLM*-6His wurden Hepatom(huH7)-Zellen auf Objektträger für Internalisierungsexperimente mit anschließender Immunfluoreszenz-Färbung ausgelegt, mit proteinhaltigem Medium inkubiert und nach dem Fixieren auf die Internalisierung bCD-spezifischer Proteine mit dem bCDTLM6His-Antikörper analysiert (Abb. 22).

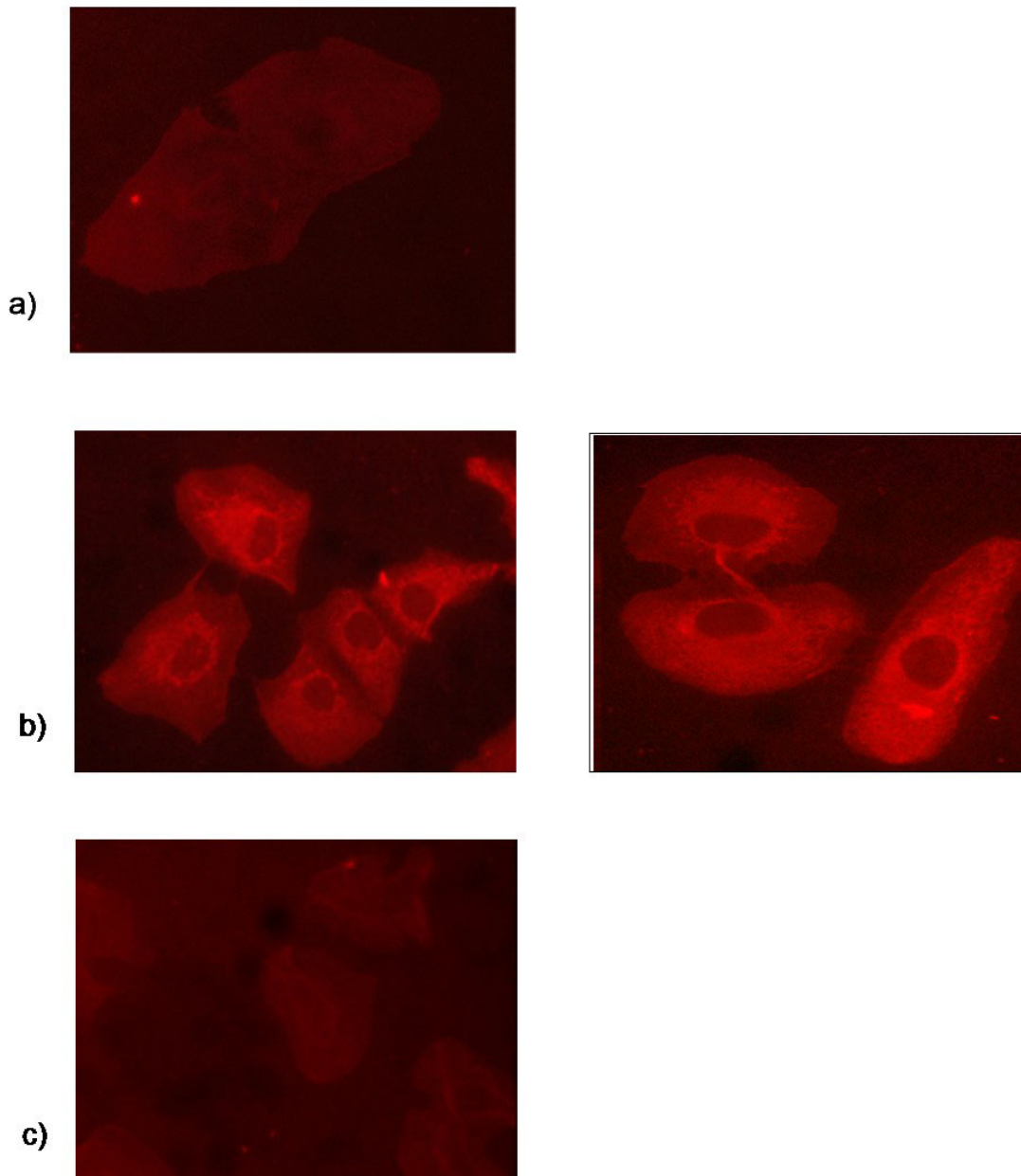


Abb. 22: Immunfluoreszenz-Färbung zum Nachweis einer Internalisierung prokaryontischer zellpermeabler Fusionsproteine in Hepatom(huH7)-Zellen

Auf Objektträger ausgelegte Hepatomzellen wurden für 30 min mit Kultivierungsmedium, das je 2 μ M Fusionsprotein enthielt, kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit kaltem PBS gewaschen, um nicht internalisiertes Protein von der Oberfläche der Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden für 10 min mit Ethanol fixiert und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit dem bCDTLM6His-Antikörper, der 1:100 in Blockierungslösung verdünnt wurde. Für die Visualisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der gegen Kaninchen gerichtete, Cy^{TM3}-konjugierter Sekundärantikörper 1:800 verdünnt eingesetzt.

- a) huH7-Zellen mit HBV-*TLM*-bCD-6His
- b) huH7-Zellen mit bCD-HBV-*TLM*-6His
- c) huH7-Zellen mit bCD-6His

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigen nach 30minütiger Inkubation eine eindeutige Internalisierung des zellpermeablen Fusionsproteins bCD-HBV-*TLM*-6His (Abb. 22 b) in das Cytosol der Hepatomzellen. Bei dem wt-Protein bCD-6His sowie dem Fusionsprotein mit N-terminalem HBV-*TLM* konnte dagegen keine signifikante Anfärbung der Zellen detektiert werden.

Für detailliertere Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation des translokalisierten Fusionsproteins bCD-HBV-*TLM*-6His wurden die Präparate mit einem konfokalen Laserscanmikroskop mikroskopiert, das eine schichtweise Aufnahme der Zellen ermöglicht. In der Abb. 23 ist eine sog. Galerie (*z-stack*) verschiedener Schichten einer Hepatomzelle mit internalisiertem bCD-HBV-*TLM*-6His-Fusionsprotein dargestellt. Gut zu erkennen ist hier eine gleichmäßige Verteilung des internalisierten Proteins im Cytoplasma der Hepatomzellen, wobei der Zellkern davon ausgenommen ist. Die Verteilung des internalisierten Proteins in der Zelle änderte sich auch bei einer Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Fusionsprotein nicht.

Die Aussage zur cytoplasmatischen, extranukleären Lokalisation des Proteins korreliert mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse nach subzellulärer Zellfraktionierung, bei der ebenfalls in der cytosolischen Zellfraktion internalisiertes Protein nachgewiesen werden konnte.

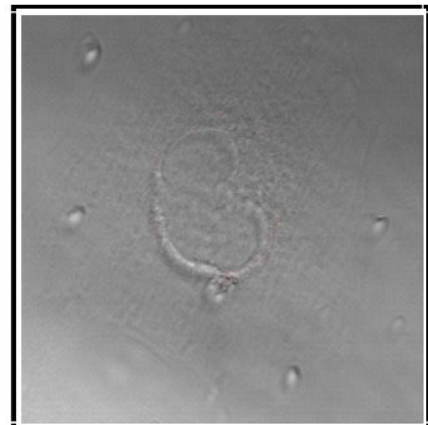
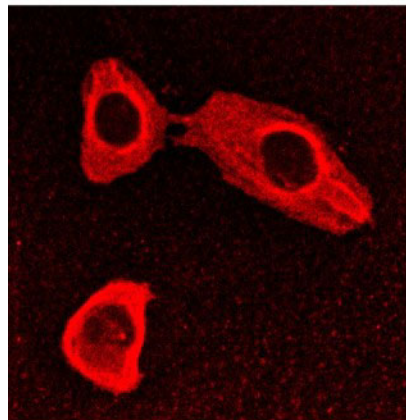
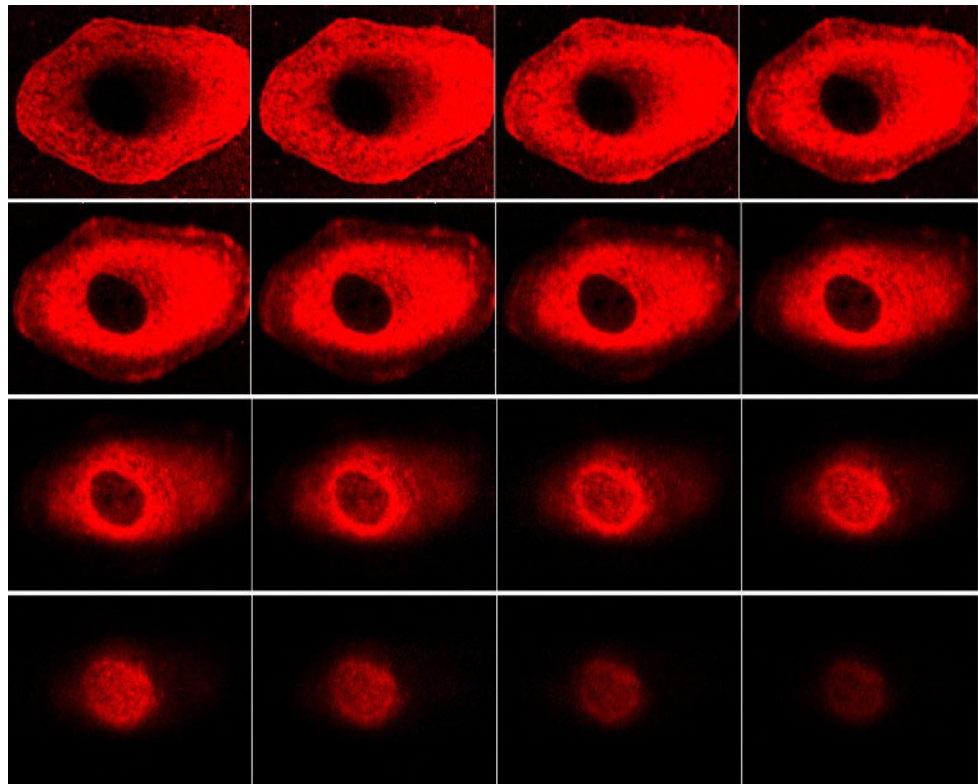


Abb. 23: Subzelluläre Lokalisation des internalisierten Suizidproteins bCD-HBV-TLM-6His im Cytoplasma der Hepatomzellen

- a) Galerie von Schnitten durch eine einzelne huH7-Zelle
- b) mehrere huH7-Zellen mit spezifisch angefärbtem HBV-TLM-bCD-6His
- c) parentale huH7-Zellen (aufgenommen mit Transmissionslicht)

4.2. Eukaryontische Plasmidkonstrukte

4.2.1. Subklonierung

Als Ausgangsplasmid für die Subklonierung eukaryontischer Expressionsvektoren diente das Plasmid pcDNA3. Die Nukleotidsequenzen für die eukaryontischen Fusionsproteine wurden auch hier über eine Standard-PCR mit sequenzspezifischen Überhangoligonukleotiden erzeugt. Das Zellpermeabilität vermittelnde HBV-*TLM* wurde entweder am 3'- bzw. 5'-Ende der codierenden Sequenz für die bCD fusioniert. Zusätzlich erhielten alle Konstrukte am entgegengesetzten Ende zum HBV-*TLM* einen 6His-Tag. Beidseitig wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle für das Einfügen in den Expressionsvektor angefügt. Folgende Konstrukte wurden für die Ligation mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 erzeugt:

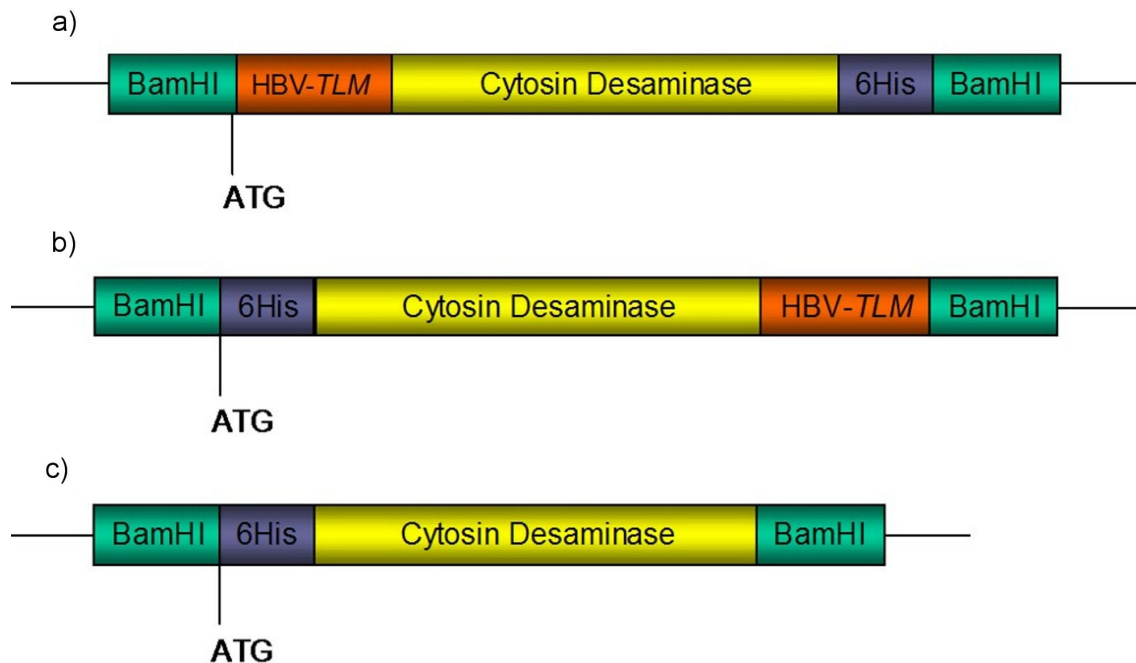


Abb. 24: Schematische Darstellung der eukaryontischen Expressionskonstrukte

- a) HBV-*TLM*-bCD-6His
- b) 6His-bCD-HBV-*TLM*
- c) 6His-bCD (Wildtyp wt)

bestehend aus der Nukleotidsequenz für die Cytosin Desaminase mit mutiertem Startcodon. Bei den zellpermeablen Konstrukten wurde am 3'-bzw. 5'-Ende mittels Überhangoligonukleotiden die Nukleotidsequenz für das HBV-*TLM* fusioniert sowie alternierend dazu ein 6His-Tag.

Alle erzeugten Expressionsplasmide wurden im Bereich der eingefügten Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung überprüft.

4.2.2. Proteinchemische und funktionelle Charakterisierung der mit bCD-Fusionskonstrukten stabil transfizierten Hepatomzellen

4.2.2.1. Nachweis der Integration in das Genom

Um nachzuweisen, dass die ausgewählten, transfizierten Zellpopulationen die Suizidgene stabil in ihr Genom integriert haben, wurden nach der Präparation der genomischen DNA aus den Zellen und der Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie Standard-PCRs mit konstruktsspezifischen Oligonukleotiden und 150 ng genomischer DNA als *template* durchgeführt. Als Negativkontrolle diente genomische DNA von parentalen HepG2-Zellen.

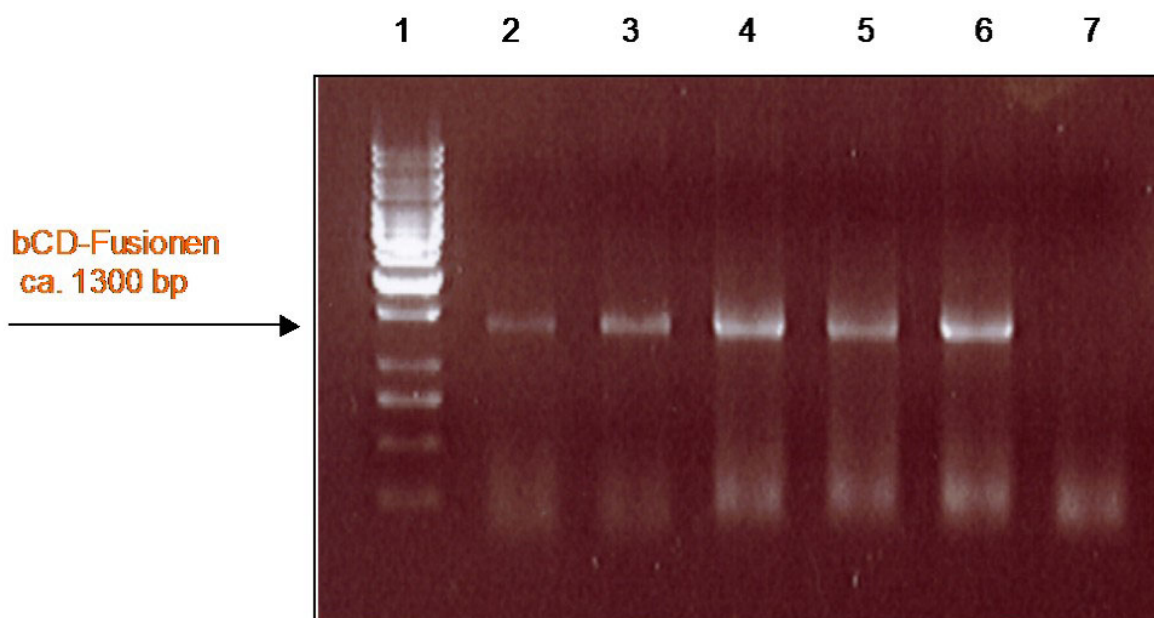


Abb. 25: Standard-PCR genomischer DNA von stabil exprimierenden Hepatomzellen

Die Analyse von je 10 µl der PCR-Ansätze erfolgte in einem 1%-Agarosegel.

Spur 1: DNA-Marker (1 kb, Fa. peqlab), Spur 2: HepG2-6His-bCD 1.8, Spur 3: HepG2-6His-bCD 1.17, Spur 4: HepG2-6His-bCD-HBV-TLM 2.7, Spur 5: HepG2-6His-bCD-HBV-TLM 2.31, Spur 6: HepG2-HBV-TLM-bCD-6His 3.15, Spur 7: HepG2 (Negativkontrolle)

Anhand des DNA-Größenstandards konnte bei allen fünf analysierten Zellpopulationen amplifizierte DNA in der bCD-spezifischen Größe von ca. 1.300 bp detektiert werden (Abb. 25). Bei den parental HepG2-Zellen in Spur 7 wurde erwartungsgemäß keine bCD-spezifische DNA amplifiziert. Zur Vereinfachung wurde für alle PCR-Reaktionen eine Annealing-Temperatur von 57 °C gewählt. Die detektierten Unterschiede in der Intensität der amplifizierten DNA-Banden lassen sich vermutlich auf die nicht für alle Primerkombinationen optimale Annealing-Temperatur zurückführen. Eine stabile Integration der fusionierten Suizidgene in das Genom konnte jedoch bei allen stabil transfizierten Hepatomzellen eindeutig nachgewiesen werden. Für weitere Versuche wurden die Populationen HepG2-6His-bCD 1.8, HepG2-6His-bCD-HBV-*TLM* 2.31 und HepG2-HBV-*TLM*-bCD-6His 3.15 ausgewählt. Um einem Verlust des Transgens vorzubeugen, wurde der Selektionsdruck weiterhin aufrechterhalten und die Zellen dauerhaft in Medium mit 700 µg/ml G418 kultiviert.

4.2.2.2. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Proteinexpression von Fusionsproteinen nach stabiler Transfektion

Um zu untersuchen, ob die stabil transfizierten Hepatomzellen die Fusionsproteine synthetisieren, wurden Gesamtzellextrakte von den transfizierten Zellen in der Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein bCD-spezifischer Proteine analysiert.

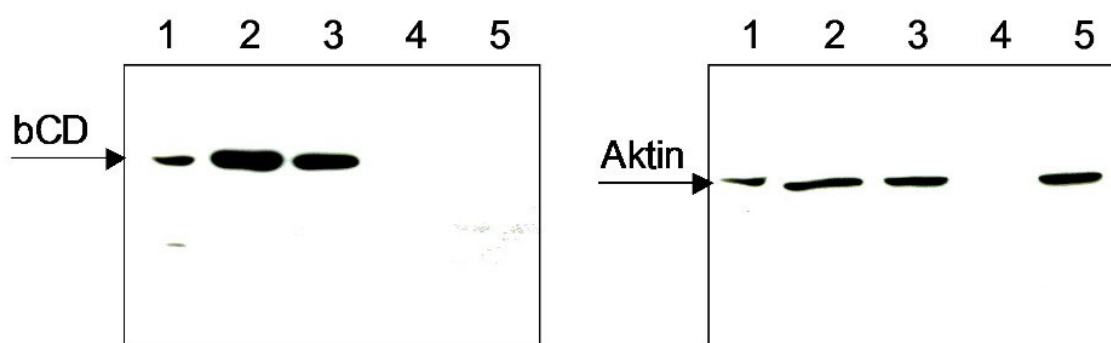


Abb. 26: Nachweis der Expression von Fusionsproteinen in stabil transfizierten HepG2-Zellen

Es wurden jeweils 5×10^5 transfizierte Hepatomzellen in 6 cm-Schalen ausgelegt und daraus nach 36 h Gesamtzellextrakte gewonnen. Die Extrakte wurden durch Zugabe von Lysepuffer in ihrem Gesamtproteingehalt aufeinander abgestimmt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von 16 μ l Gesamtzellextrakt und Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der proteinspezifische Nachweis der exprimierten Fusionsproteine mit dem rabbit antiCDTLM6His-Antikörper, 1:400 verdünnt, und einem gegen Kaninchen gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper, in einer Verdünnung von 1:2.000. Als Negativkontrolle wurde Gesamtzellextrakt von parentalen HepG2-Zellen aufgetragen (oben). Der Nachweis, dass in allen Spuren gleiche Mengen Zellextrakt, bezogen auf die Gesamtproteinmenge, analysiert wurden, erfolgte mit einem gegen Aktin gerichteten Antikörper (sc-1616), 1:100 verdünnt (unten). Spur 1: Gesamtzelllysate HepG2-6His-bCD 1.8, Spur 2: Gesamtzelllysate HepG2-6His-bCD-HBV-TLM 2.31, Spur 3: Gesamtzelllysate HepG2-HBV-TLM-6His 3.15, Spur 4: LMW-Marker ungefärbt, Spur 5: Gesamtzelllysate HepG2 (Negativkontrolle)

Im oberen Teil der in Abb. 26 dargestellten Western-Blot-Analyse konnte eine Expression von Fusionsproteinen in allen drei untersuchten Zellpopulationen in der postulierten Größe von ca. 48 kD nachgewiesen werden. Unterschiede in der Menge der gebildeten Fusionsproteine konnten in Abhängigkeit von der Zellpopulation festgestellt werden. Die größte Menge wurde bei dem Protein mit dem

C-terminal fusionierten HBV-*TLM* detektiert. Bei dem wt-Protein dagegen konnte nur eine verminderte Menge gebildetes Protein nachgewiesen werden, die jedoch aufgrund der ebenfalls geringeren Menge an Aktin auf Fehler beim Gesamtproteinabgleich zurückgeführt wurden. Im Bereich von ca. 30 kD ist beim wt-Protein zusätzlich eine leichte Fragmentierungsbande zu beobachten, die auf eine Degradation des Proteins hindeutet. Berücksichtigt man die postulierte Eigenschaft einer durch das fusionierte HBV-*TLM* vermittelten Zellpermeabilität der Suizidproteine, so können vergleichende Aussagen zur Menge der gebildeten Fusionsproteine nicht oder nur mit Einschränkung getroffen werden.

Bei kürzerer Belichtungszeit konnte außerdem beobachtet werden, dass alle Fusionsproteine als Doppelbande erkannt wurden (nicht dargestellt), was auf eine zumindest teilweise posttranslationale Modifikation der Proteine schließen ließ. In Spur 4, in der Gesamtzelllysat parentaler Hepatomzellen aufgetragen wurde, konnte erwartungsgemäß keine bCD-spezifische Proteinbande detektiert werden.

4.2.2.3. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung und intrazelluläre FACS-Analyse von eukaryontisch gebildeten Fusionsproteinen zum Nachweis der Proteinbiosynthese

Um über eine mikroskopische Visualisierung angefärbter Proteine vergleichende Aussagen zur Proteinexpression treffen zu können, wurden die stabil transfizierten Hepatomzellen für eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung auf Objektträger ausgelegt, fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie intrazellulär auf bCD-spezifische Proteine mit dem rabbit anti**bCDTLM6His**-Antikörper und einem CyTM3-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die Definition der Hintergrundfärbung erfolgte mit parental HepG2-Zellen, die sowohl mit Primär- als auch mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Mit dieser Einstellung erfolgte anschließend die mikroskopische Untersuchung der transfizierten Hepatomzellen (Abb. 27). Um auch nicht proteinspezifisch angefärbte Zellen sichtbar zu machen, wurden die Zellen zusätzlich mit Phalloidin-FITC inkubiert, welches spezifisch an das Aktin der Zellen bindet und es mit FITC markiert.

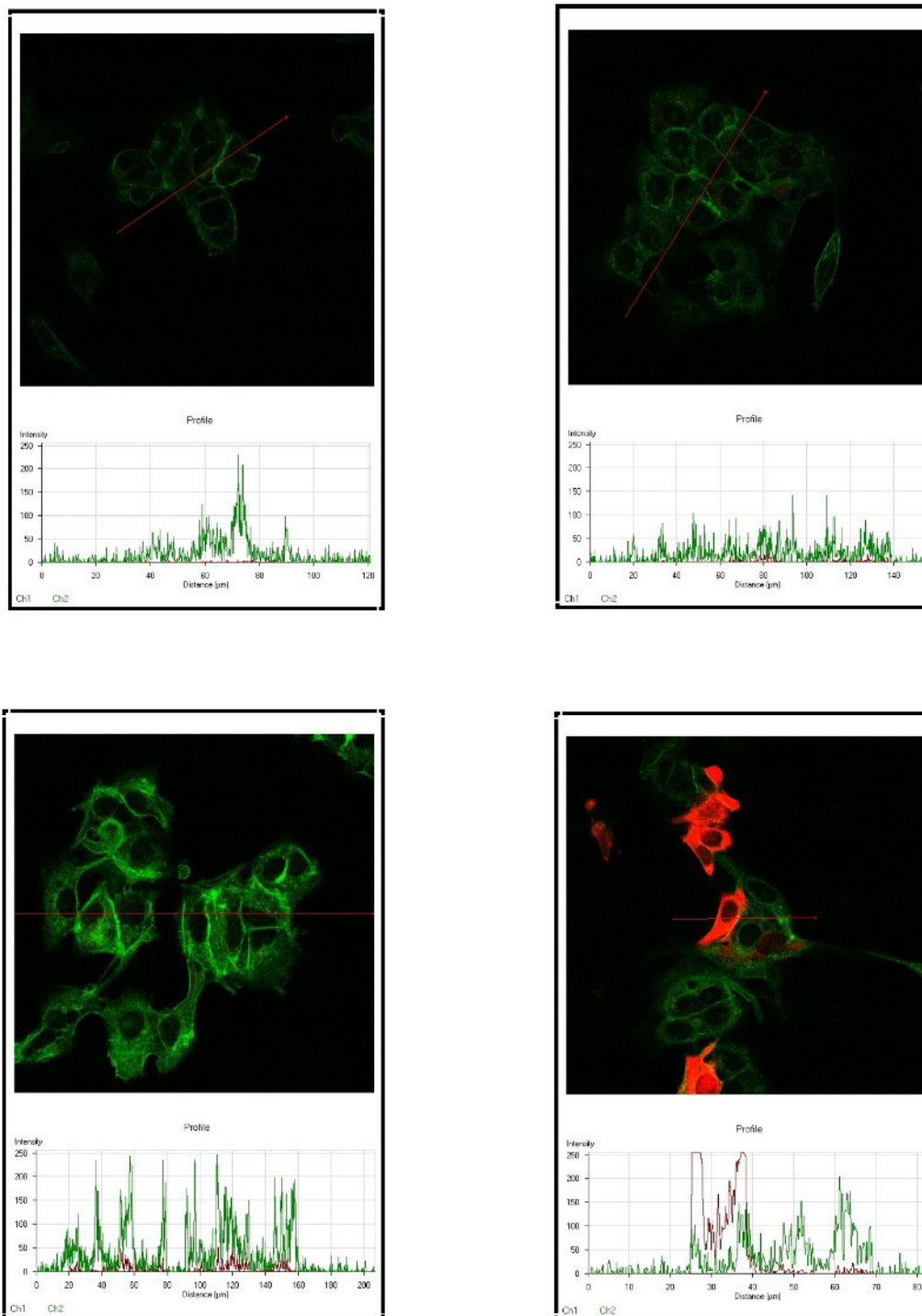


Abb. 27: Immunfluoreszenzmikroskopie von stabil transfizierten Hepatomzellen zum Nachweis bCD-spezifische Fusionsproteine

Die auf Objektträger ausgelegten, transfizierten Zellen wurden nach 24 h mit Ethanol fixiert. Die indirekte Fluoreszenzfärbung erfolgte mit dem rabbit antiCDTLM6His-Antikörper, 1:100 verdünnt, und CyTM3-conjugated AffiniPure anti-rabbit IgG, Jackson Immuno Research, 1:800 verdünnt. kLSM 510; C-Apochromat-Objektiv 63x/1.2 W corr.

links oben HepG2-Zellen (Kontrollzellen), rechts oben HepG2-6His-Cytosin Desaminase 1.8 (wt), links unten HepG2-6His-Cytosin Desaminase-HBV-TLM 2.31, rechts unten HepG2-HBV-TLM-Cytosin Desaminase-6His 3.15

Die Untersuchung der Zellen im konfokalen Laserscanmikroskop ergab, dass lediglich bei den Zellen, die Proteine mit N-terminal fusioniertem HBV-*TLM* produzieren, größere Mengen bCD-spezifischer Proteine visualisiert werden können. Ein Teil dieser Zellpopulation (HepG2-HBV-*TLM*-bCD-6His) zeigt eine sehr starke cytoplasmatische Anfärbung, während Zellen in unmittelbarer Nähe der gefärbten Zellen nur eine kaum sichtbare Färbung aufweisen. Bei den anderen beiden Zellpopulationen konnten bei mikroskopischer Visualisierung dagegen nur eine sehr schwache bis keine Anfärbung des Cytosols detektiert werden. In der wesentlich empfindlicheren Profil-Darstellung, in der die Fluoreszenzintensität (Kanal 1: 543 nm-rot, Kanal 2: 488 nm grün) über dem gewählten Bereich dargestellt wurde, konnte jedoch bei allen transfizierten Zellpopulationen eine leichte Anfärbung der Zellen, detektiert als Rotfluoreszenz, beobachtet werden, die über die Hintergrund-Färbung der Kontrollzellen hinausgeht.

Um die Aussagen der indirekten Immunfluoreszenz, bei der lediglich bei einem Teil der Hepatomzellen HepG2-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His 3.15 intrazellulär signifikante Mengen an Protein detektiert werden konnten, zu überprüfen, wurden die transfizierten Zellpopulationen nach intrazellulärer Markierung zusätzlich mittels FACS analysiert. Dazu wurden 5×10^5 Zellen mit Formaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen mit dem Detergenz Saponin erfolgte die Inkubation mit dem rabbit antiCDTLM6His-Antikörper sowie dem gegen Kaninchen IgG gerichteten, CyTM3-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach intensivem Waschen erfolgte die Einzelzellanalyse auf markierte Proteine mit einem FACSCalibur-Gerät. Die FACS-Daten wurden mit Programm CellQuest ausgewertet.

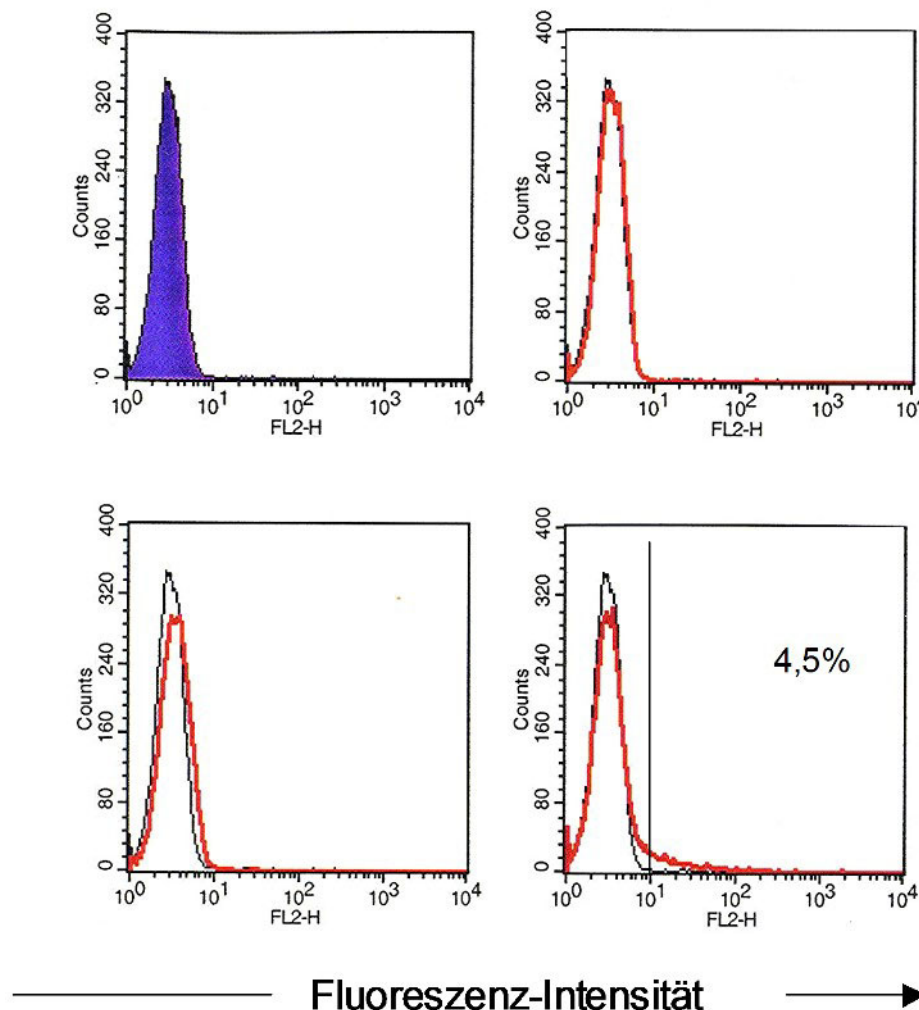


Abb. 28: Quantitative FACS-Analyse der bCD-Expression

Dargestellt ist die FL2-H-Fluoreszenz der Einzelzellen nach intrazellulärer Markierung mit rabbit anti bCD TLM6His, 1:100 verdünnt und CyTM3-conjugated AffiniPure anti-rabbit IgG, 1:300 verdünnt, der parentalen HepG2-Zellen (links oben, notwendig zur Einstellung der Hintergrund-Kalibrierung), HepG2-6His-Cytosin Desaminase 1.8-Zellen (rechts oben), HepG2-6His-Cytosin Desaminase-HBV-TLM 2.31-Zellen (links unten) und HepG2-HBV-TLM-Cytosin Desaminase-6His 3.15-Zellen (rechts unten).

Die Fluoreszenz-Verteilung der HepG2-Zellen (Abb. 28 oben) wurde bei der Analyse der stabil transfizierten Zellen als Maß für die Eigenfluoreszenz der Hepatomzellen (schwarze Kurve) verwendet. Bei der intrazellulären FACS-Analyse der Zellpopulationen, die mit wt-Protein 6His-Cytosin Desaminase 1.8 (Abb. 28 obere Mitte) und mit 6His-Cytosin Desaminase-HBV-TLM 2.31 (Abb. 28 untere Mitte) transfiziert wurden, konnten ähnlich wie in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie keine markierten bCD-spezifischen Proteine detektiert werden. Die

Fluoreszenzverteilungen dieser beiden Zellpopulationen verhielten sich wie die der parentalen Hepatomzellen. Eine leichte Verschiebung der gesamten Verteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte lediglich bei den Zellen HepG2-6His-Cytosin Desaminase-HBV-*TLM*-2.31 beobachtet werden (Abb. 28 untere Mitte). Diese Verschiebung wurde jedoch auf morphologische Veränderungen dieser Zellpopulation zurückgeführt, die bereits kurz nach deren Selektionierung erstmals auftrat. Die Population erschien unter dem Mikroskop granulärer als die Kontrollzellen, so dass mit einer Veränderung in der Eigenfluoreszenz gerechnet werden musste. Synthetisierte, bCD-spezifische Proteine konnten in der FACS-Analyse ausschließlich bei den Zellen HepG2-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His-3.15 detektiert werden (Abb. 28 unten). Die Fluoreszenzverteilung dieser Zellpopulation läuft im Vergleich zu den Kontrollzellen mit einer leichten Schulter aus. Bei der statistischen Auswertung der Messdaten wurden ca. 4,5% der Zellen HepG2-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His 3.15 identifiziert, bei denen sich synthetisiertes Protein signifikant markieren ließ. Bei den beiden anderen Zellpopulationen konnten dagegen nur einige wenige, sehr schwach fluoreszierende Zellen registriert werden, die weniger als 1% der Gesamtpopulation entsprachen. Diese Ergebnisse bestätigen im Wesentlichen die Beobachtungen der indirekten Immunfluoreszenz, bei der ebenfalls lediglich in den transfizierten Hepatomzellen HepG2-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His 3.15 signifikante Mengen bCD-spezifisches Protein nachgewiesen werden konnte. Auch in der Immunfluoreszenz erschien nur ein sehr geringer Teil dieser Zellpopulation bCD-positiv.

4.2.2.4. Funktionalität der eukaryontischen Fusionsproteine

Da aufgrund der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse grundsätzlich von einer Synthese aller Suizidproteine ausgegangen werden konnte, sollte über den Nachweis einer Desaminierung des *prodrugs*, als Grundvoraussetzung für einen Einsatz in der Suizidgentherapie, die enzymatische Aktivität der Suizidproteine in den Hepatomzellen analysiert werden. Da das metabolisierte *prodrug* (5FU) in den Zellen cytotoxisch wirken soll, eignen sich für die Messung eines enzymatischen Umsatzes des *prodrugs* 5FC prinzipiell alle Proliferations- und Zelltodassays. Eine einfache, reproduzierbare Methode zur Bestimmung cytotoxischer

Effekte eines toxischen Metaboliten ermöglicht der SRB-Assay nach Skehan et al. 1990. Dieser Test beruht auf der Bindung des Proteinfarbstoffs Sulforhodamin B (SRB) an zelluläre Proteine, so dass die Zunahme der Biomasse über die Farbstoffmenge quantifiziert werden kann. Um einen cytotoxischen Effekt des *prodrugs* 5FC auf die HepG2-Zellen quantifizieren und diesen bei der Untersuchung der stabil transfizierten Zellen auszuschließen zu können, wurden zunächst parentale HepG2-Zellen mit verschiedenen 5FC-Mengen versetzt und auf cytotoxische Effekte analysiert.

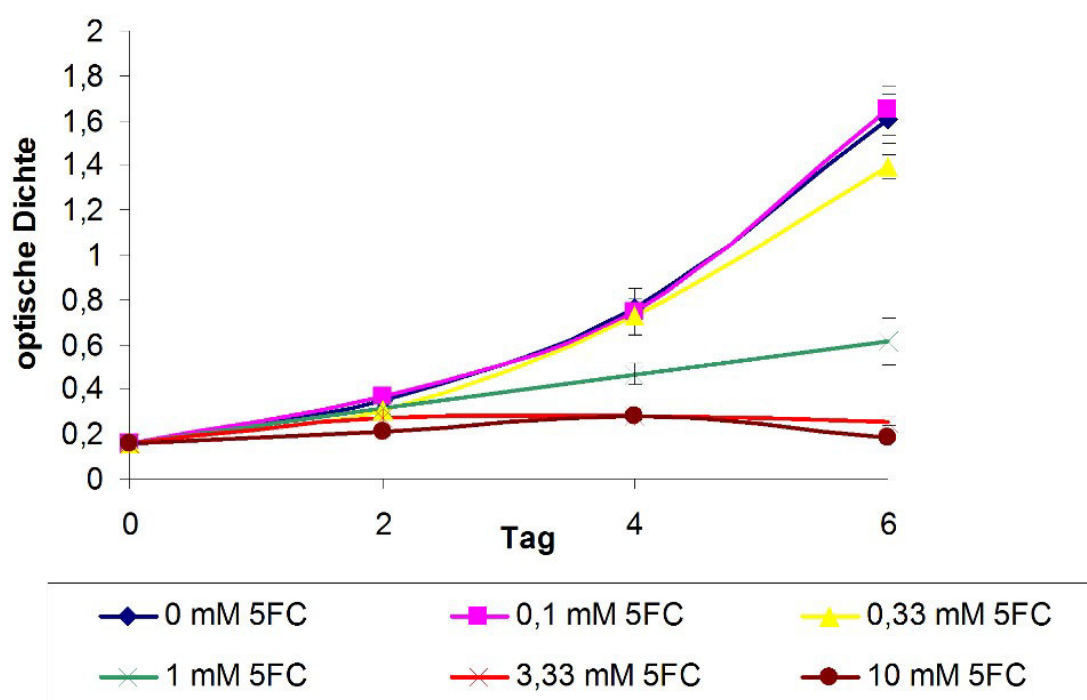


Abb. 29: SRB-Test: Hepatom(HepG2)-Zellen nach Inkubation mit 5FC
 Je 1×10^4 Zellen wurden pro Kavität einer 24-Lochplatte ausgesät und für 6 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an 5FC inkubiert. Die Proliferation wurde über das Anfärben der zellulären Proteine mit SRB-Farbstoff bestimmt. Bei allen Ansätzen handelt es sich um Vierfachbestimmungen, die dargestellten Werte sind Mittelwerte. Die prozentuale Standardabweichung betrug maximal 15%. Die gemessene optische Dichte, die sich aus dem aufgenommenen SRB-Farbstoff ergab, wurde über der Anzahl der Inkubationstage aufgetragen.

In Abb. 29 wurde das Wachstum der parentalen HepG2-Zellen als Zunahme der optischen Dichte in Abhängigkeit von der zugesetzten *prodrug*-Konzentration dargestellt. Eine Beeinflussung der Proliferation der HepG2-Zellen durch die Anwesenheit des *prodrugs* im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 0,1 mM konnte nicht festgestellt werden. Mit steigender Konzentration an 5FC über diesen

Bereich hinaus, ist jedoch mit einer zunehmenden Inhibierung des Zellwachstums der Hepatomzellen zu rechnen, die bereits bei einer Konzentration von 0,33 mM zu einer 10%igen Hemmung der Proliferation führt. Da durch das Fehlen des Enzyms bCD in den verwendeten Hepatomzellen eine Desaminierung von 5FC zum cytotoxischen Metaboliten 5FU ausgeschlossen werden kann, ist die beobachtete Wachstumshemmung nur auf zu hohe, cytotoxische Konzentrationen an *prodrug* zurückzuführen. Für weitere Versuche wurde deshalb ein Konzentrationsbereich für die *prodrug* von 0 bis max. 0,2 mM festgelegt. Die HepG2-Zellen wurden im Folgenden als nicht transfizierte Kontrolle eingesetzt und als 100%-Wert verwendet. Für den Nachweis einer enzymatischen Aktivität in den transfizierten Zellen wurden diese ebenfalls mit verschiedenen *prodrug*-Konzentrationen für 6 Tage inkubiert (Abb. 30).

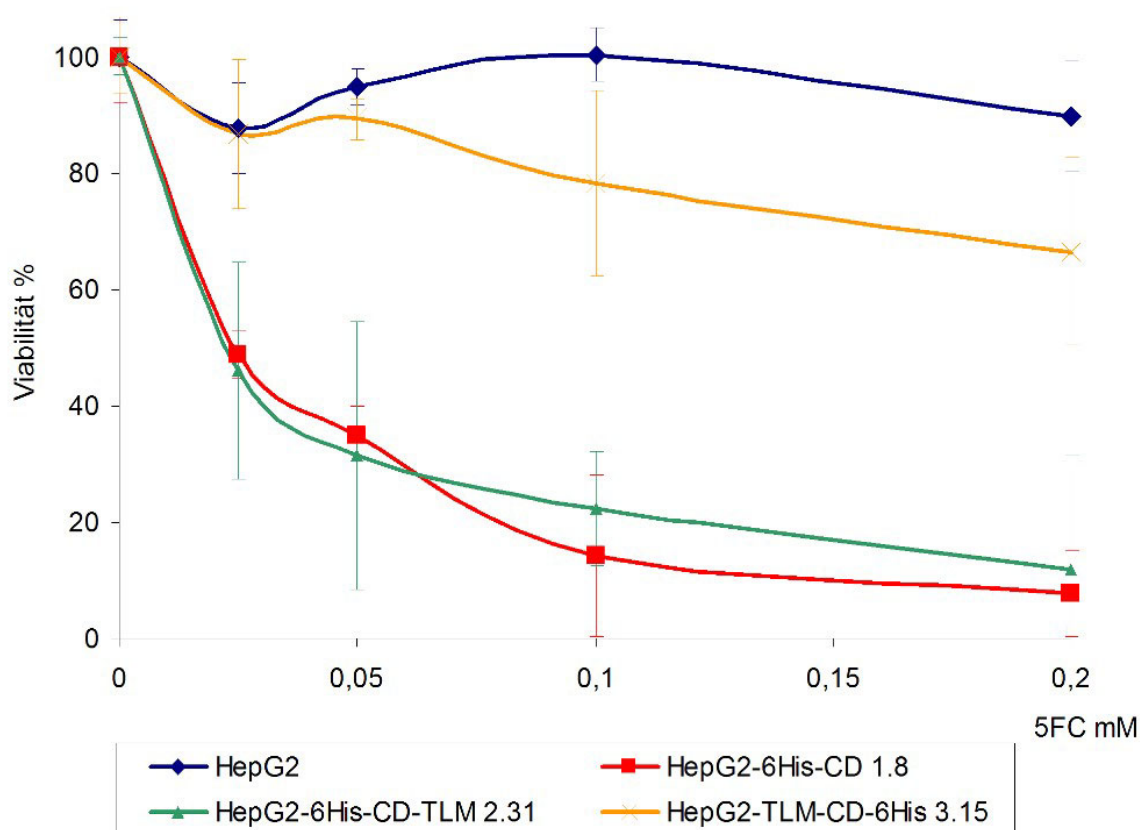


Abb. 30: Cytotoxizitätsassay: Stabil transfizierte Zellen nach Inkubation mit dem *prodrug* 5FC

Je 1×10^4 stabil transfizierte Zellen pro Kavität einer 24-Lochplatte wurden ausgesät und für 6 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an 5FC inkubiert. Die Proliferation wurde über das Anfärben der zellulären Proteine mit SRB-Farbstoff bestimmt. Bei allen Ansätzen handelt es sich um Achtfachbestimmungen, die dargestellten Werte sind Mittelwerte. Die prozentuale Standardabweichung betrug maximal 20%. Das Überleben der Zellen wurde als prozentuale Viabilität, bezogen auf das Wachstum unbehandelter Zellen, über der *prodrug*-Konzentration aufgetragen.

Abb. 30 zeigt, dass die Bildung des Suizidproteins bCD bei stabil transfizierten Zellen auch unter Berücksichtigung der mit einer bis zu 20% relativ hohen Standardabweichung mit zunehmender 5FC-Konzentration zu einer gegenüber untransfizierten HepG2-Zellen verstärkten Hemmung des Zellwachstums führt, was auf eine Metabolisierung des *prodrugs* durch enzymatisch aktive Proteine und eine daraus resultierende Cytotoxizität bei den transfizierten Zellen schließen lässt. Signifikant ist die Inhibierung der Proliferation bei den Zellen, welche die Proteine 6His-Cytosin Desaminase-HBV-*TLM* und 6His-Cytosin Desaminase synthetisieren. Beide Zellpopulationen zeigen bereits im für die naiven Hepatomzellen nicht cytotoxischen Konzentrationsbereich (0-0,1 mM 5FC) eine ca. 75-90 %ige Inhibierung des Zellwachstums. Insbesondere die Transfektion von Hepatomzellen mit den eukaryontischen Expressionsplasmiden, die eine Kasette für die Expression von wt-Protein bzw. bCD-HBV-*TLM* enthalten, führt zu einer funktionellen, intrazellulären Enzymaktivität, die eine Umsetzung der *prodrug* 5FC zum hochtoxischen Chemotherapeutikum 5FU und damit eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums ermöglicht. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins mit aminoterminal fusioniertem HBV-*TLM* erschien dagegen stark eingeschränkt.

4.2.2.5. Nachweis einer katalytischen Aktivität im Gesamtzelllysat transfizierter Hepatomzellen

Mit dem Cytotoxizitätsassay konnte eine unterschiedliche, von der Positionierung des HBV-*TLM* abhängige, Funktionalität der von den transfizierten Hepatomzellen synthetisierten Fusionsproteine festgestellt werden. Um diese Ergebnisse näher zu charakterisieren, wurde die enzymatische Aktivität im Gesamtzelllysat der Zellen über die Umsetzung von Cytosin zu Uracil mittels HPLC untersucht.

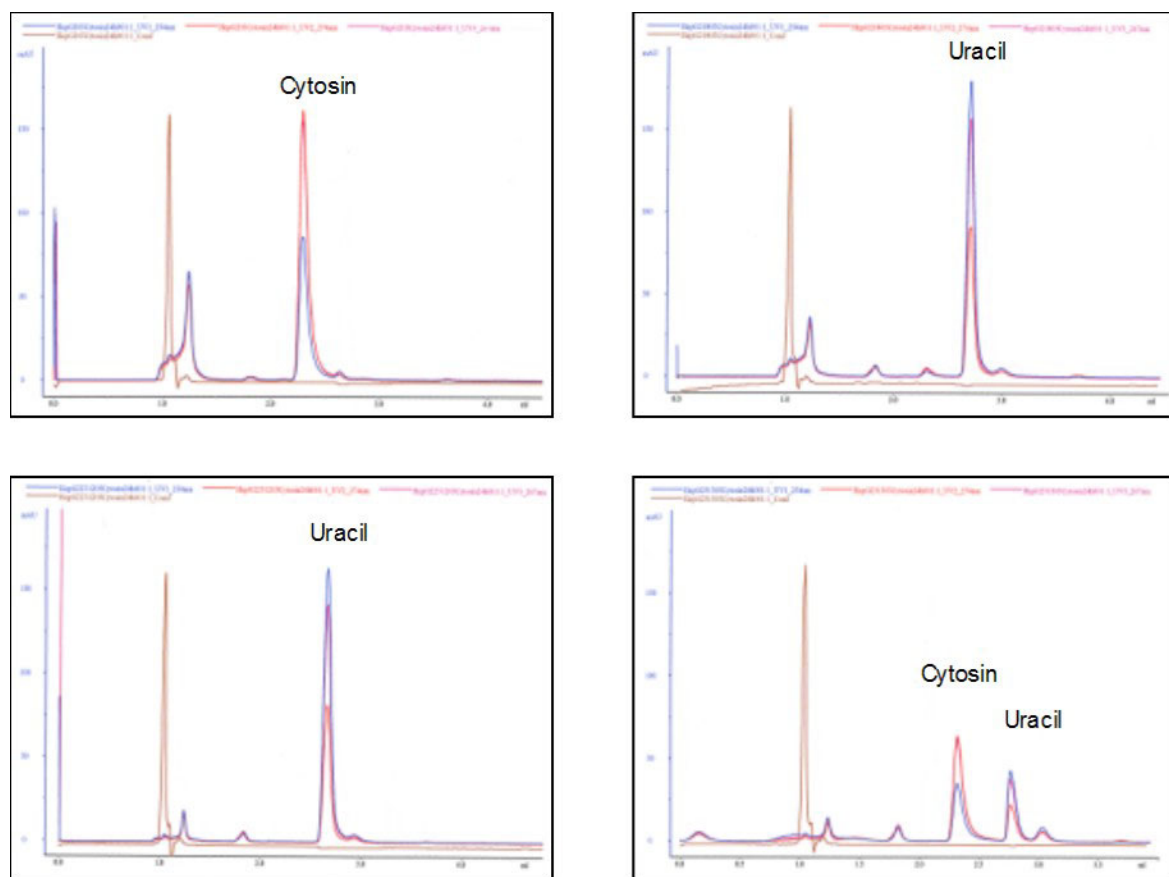


Abb. 31: Nachweis der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch eukaryontische Suizidproteine

Gesamtzellextrakte aus den stabil transfizierten Zellen wurden mit 0,5 mM Cytosin-Lösung versetzt und bei RT inkubiert. Nach 24 h wurden die Reaktionen mit 10 mM EDTA terminiert und die Ansätze bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Die Analyse von je 10 µl Reaktionsansatz erfolgte mittels Reversed Phase-Chromatographie mit einer RP-C18-Säule der Fa. Knauer, die isokratisch mit 50 mM Na-Acetat, pH 4,6 mit einem Fluss von 0,5 ml/min betrieben wurden. Als Negativkontrolle wurde Gesamtzelllysate von parentalen HepG2-Zellen (Abb. 32 oben links) mit Cytosin versetzt. In den Chromatogrammen dargestellt wurde die Absorption (blau 254 nm, lila 267 nm, rot 274 nm) in mAU über dem Elutionsvolumen in ml. Oben links Gesamtzelllysate HepG2, oben rechts Gesamtzelllysate HepG2-6His-bCD 1.8, unten links Gesamtzelllysate HepG2-6His-bCD-HBV-TLM 2.31 und unten rechts Gesamtzelllysate HepG2-HBV-TLM-bCD-6His.

Die Analyse der enzymatischen Aktivität im Gesamtzelllysate der transfizierten Hepatomzellen über die Reversed Phase-Chromatographie bestätigt die Ergebnisse des Cytotoxizitäts-Assays. Bei den Zelllysaten der Hepatomzellen, die das wt-Protein (Abb. 31 oben rechts) bzw. Cytosin Desaminase C-terminal fusioniert mit dem HBV-TLM (Abb. 31 unten links) bilden, konnte nach 24 Stunden eine vollständige Umsetzung des zugesetzten Cytosins zu Uracil nachgewiesen werden. Eine deutlich geringere enzymatische Aktivität wurde im Gesamtzelllysate,

welches das Fusionsprotein mit N-terminal fusioniertem HBV-*TLM* (Abb. 31 unten rechts) enthielt, gemessen. Hier konnte weniger als die Hälfte des zugesetzten Substrats katalytisch umgesetzt werden. Für alle drei Zellpopulationen konnte im Vergleich zu den parental Hepatomzellen eine enzymatische Umsetzung des zugesetzten Cytosin zu Uracil und damit eine Biosynthese enzymatisch aktiver Proteine gezeigt werden.

4.2.3. Nachweis der Zellpermeabilität eukaryontischer Fusionsproteine

4.2.3.1. Quantifizierung einer durch HBV-*TLM* vermittelten Zellpermeabilität und Überprüfung der Funktionalität nach dem Export der Fusionsproteine aus den primär produzierenden Zellen

Um einen gegenüber dem wt-Protein verstärkten Export der Fusionsproteine aus den stabil produzierenden Zellen hinaus nachzuweisen, wurde der Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen auf das Vorhandensein von Fusionsproteinen überprüft. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die HBV-*TLM*-Fusionsproteine nach der postulierten Translokation aus den transfizierten Zellen in das umgebene Medium in einer enzymatisch aktiven Form vorliegen und eine Umsetzung von Cytosin zu Uracil nachgewiesen werden kann. Für den spezifischen Nachweis auf Vorhandensein von zellpermeablen Proteinen im Zellkulturüberstand wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, bei denen jedoch kein bCD-spezifisches Protein nachgewiesen werden konnte. Auch bei dem Versuch, zellpermeable, 6His-getagte Fusionsproteine aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen vor der Western-Blot-Analyse über eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose anzureichern, wurden nur unzureichende Ergebnisse erzielt, die keine reproduzierbaren Aussagen bezüglich des Vorhandenseins zellpermeabler Proteine zuließen (nicht dargestellt). Über den Nachweis einer enzymatischen Umsetzung von Cytosin zu Uracil im Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen sollte deshalb der indirekte Nachweis für das Vorhandensein von zellpermeablen Fusionsproteinen im ZKÜ erbracht werden. Die Analysen sind in Abb. 32 dargestellt.

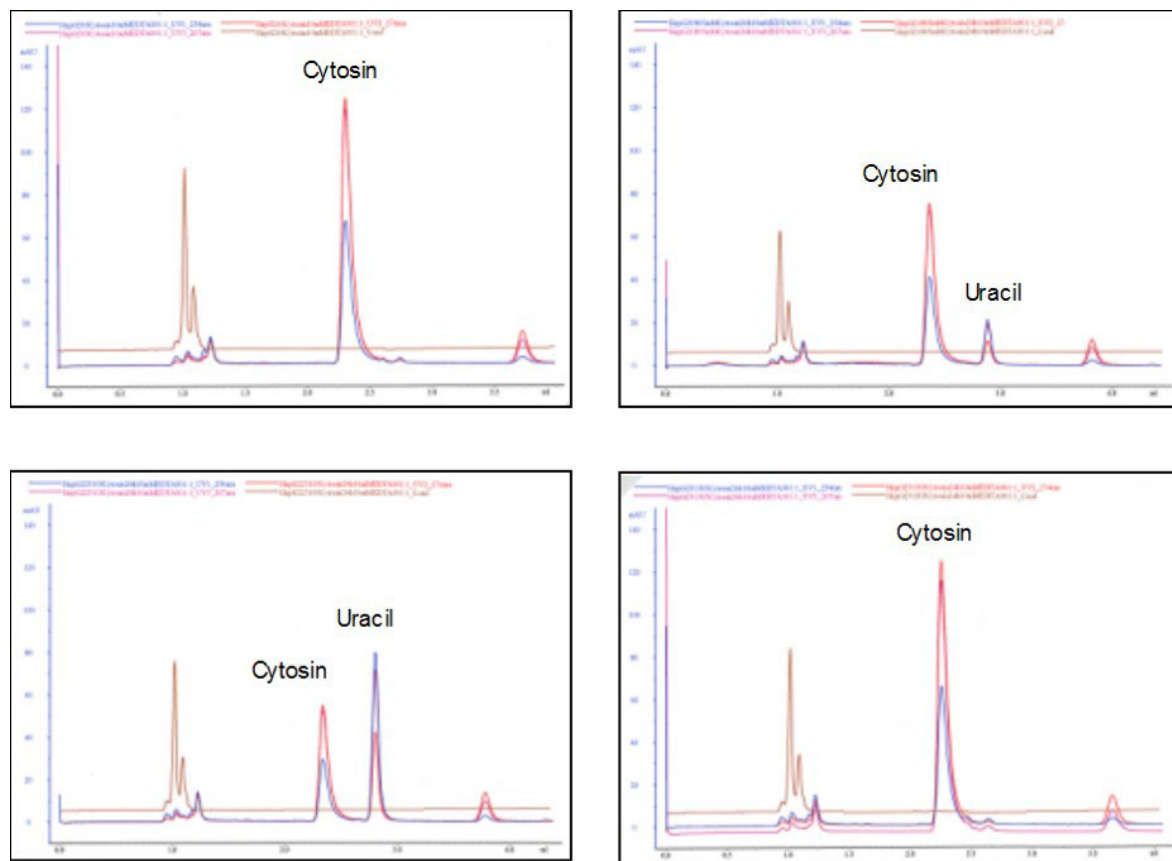


Abb. 32: Nachweis der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch zellpermeable, eukaryontisch synthetisierte Fusionsproteine

Es wurden 5×10^5 Zellen der stabil transfizierten Klone in 6 cm-Schalen ausgelegt und der ZKÜ nach 24 h abgenommen. Tote Zellen und Zelldebris wurden pelletiert. Dem filtrierten Überstand wurde 0,5 mM Cytosin-Lösung zugesetzt und der Ansatz bei RT 20 h inkubiert. Die Terminierung erfolgte mit 10 mM EDTA. Je 10 μ l der Reaktionsansätze sind unter Verwendung der RP-C18-Säule der Fa. Knauer mit 0,5 ml/min analysiert worden. Als Laufmittel wurde 50 mM Natriumacetat, pH 4,6 verwendet. In den Chromatogrammen wurde die Absorption (blau 254 nm, lila 267 nm, rot 274 nm) in mAU über dem Elutionsvolumen in ml aufgetragen. Braun dargestellt wurde die Leitfähigkeit. Oben links ZKÜ HepG2, oben rechts ZKÜ HepG2-6His-bCD 1.8, unten links ZKÜ HepG2-6His-bCD-HBV-TLM 2.31, unten rechts ZKÜ HepG2-HBV-TLM-bCD-6His 3.15.

Eine enzymatische Desaminierung des zugesetzten Cytosins zu Uracil im Zellkulturüberstand der transfizierten Hepatomzellen HepG2-6His-Cytosin Desaminase-HBV-TLM 2.31 (Abb. 32 unten links) konnte mit den rp-Analysen nachgewiesen werden. Mehr als die Hälfte des angebotenen Cytosins wurde zu Uracil umgesetzt. Aber auch bei den HepG2-Zellen, die wt-Protein ohne fusioniertes, zellpermeabilitätsvermittelndes HBV-TLM produzieren, konnte ein deutlicher Substratumsatz beobachtet werden (Abb. 32 oben rechts). Dieser fällt zwar geringer aus als bei den Hepatomzellen, die Proteine mit C-terminal fusioniertem

HBV-*TLM* exprimieren, zeigt jedoch, dass offensichtlich ein Teil des wt-Protein nach der Synthese in das Medium gelangt. Eine enzymatische Aktivität im Zellkulturüberstand der Hepatomzellen HepG2-HBV-*TLM*-Cytosin Desaminase-6His 3.15 (Abb. 32 unten rechts) konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, obwohl im Gesamtzelllysat dieser Zellpopulation aktives Fusionsprotein detektiert werden konnte (Abb. 31 unten rechts).

5. Diskussion

Um die Wirksamkeit therapeutischer, körperfremder Proteine bei ihrem Einsatz als Suizidproteine in der Therapie maligner Erkrankungen verbessern zu können, müssen die bisher erreichten, sehr geringen Gentransferraten effektiv kompensiert werden. Eine Möglichkeit bietet die Potenzierung des *bystander* Effektes, der eine Ausbreitung des gebildeten toxischen Wirkstoffs in umliegenden Zellen bewirkt. Jüngste Veröffentlichungen zeigen, dass durch Fusion von Suizidgenen mit Sequenzen, welche Zellpermeabilität verleihen, die resultierenden Fusionsproteine befähigt werden, in benachbarte Zellen zu translokalisieren. Ausgehend von wenigen primär transduzierten Produzentenzellen gelangen die Fusionsproteine so in die nicht transduzierten Nachbarzellen und können dort ebenfalls ihre therapeutische Wirkung entfalten (Lin-Lee et al. 2002, Tasciotti et al. 2003, Wybranietz 2002). So konnte eine transzelluläre Internalisierung von rekombinanten Fusionsproteinen, bestehend aus der HSV-TK und dem Zellpermeabilität vermittelnden HIV-1 TAT-Peptid in Hek 293-Zellen sowie die Sekretion des Fusionsproteins aus stabil transfizierten Hek 293-Zellen nachgewiesen werden (Tasciotti et al. 2003). Auch die Fusion von verschiedenen Suizidgenen mit dem Protein VP22 führt zu einer potenzierten Suizidgenwirkung durch die zusätzliche Ausbreitung des Suizidproteins im HCC-Ratten-Modell (Wybranietz 2002). Lin-Lee et al. 2002 entwickelten durch die carboxyterminale Fusion des *Malaria circumsporozoite protein* (CS) an die bakterielle Cytosin Desaminase eine effiziente Transfermethode, die eine rezeptorvermittelte Aufnahme des rekombinanten Enzyms in Hepatozyten ermöglichte und die gleichzeitig zu einer Stabilisierung des Proteins durch das *bypassing* der cytosolischen proteolytischen Maschinerie führte.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit der Verstärkung der Suizidgenwirkung auf HCC-Tumorzellen durch die Fusion des Zellpermeabilität verleihenden Translokationsmotives HBV-TLM an die bakterielle Cytosin Desaminase zu charakterisieren. Dieses Enzym erschien als Modellprotein besonders geeignet, da seine Wirksamkeit in der Suizidgentherapie bereits an verschiedenen Tumorzellen wie z.B. Fibrosarcom, Adenosarcom, Gliosarcom, Pankreaskarzinom und Hepatozelluläres Karzinom nachgewiesen werden konnte (Mullen et

al., 1992, 1994, Austin and Huber, 1992, Huber et al, 1993, 1994, Kuriyama et al., 1995, Hirschowitz et al. 1995, Consalvo, et al., 1995, Richards et al., 1995, Ohwada et al., 1996, Dong et al., 1996, Rowley et al., 1996, Kanai et al., 1997, Pan et al. 2003, Kurozumi et al. 2003, Hajri et al. 2004, Wang et al. 2004). Gegenüber der Gentherapie mit anderen Suizidgenen, wie beispielsweise der HSV-TK, hat die Therapie mit dem bCD-Gen den entscheidenden Vorteil, dass für den essentiellen *bystander* Effekt kein Zell-Zell-Kontakt in Form von *gap junctions* bestehen muss, sondern das gebildete 5FU frei über die Zellmembran in umliegende Zellen diffundieren kann, was zu einer erhöhten antitumoralen Wirkung führt (Trinh et al. 1995, Domain et al. 1993). Dies ist insofern von Bedeutung, da insbesondere in transformierten Zellen die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über *gap junctions* aufgrund einer reduzierten Connexin-Expression teilweise verloren gegangen ist (Holder et al. 1993) und eine wirksame Suizidgentherapie, z.B. mit HSV-TK, deren *bystander* Effekt ausschließlich über *gap junctions* realisiert wird, bei diesen Zellen nicht mehr möglich ist. Bei *in vitro*-Vergleichen mit bCD und HSV-TK an HCC-Zellen konnte eine erhöhte antitumorale Wirkung bei der Therapie mit der bCD beobachtet werden, die sich auf die freie Diffusion des gebildeten toxischen Wirkstoffs 5FU zurückführen lässt (Kuriyama et al. 1995, Trinh et al. 1995). Dies sowie die Tatsache, dass bei *in vivo*-Versuchen zur Behandlung von Lebertumoren mit dem HSV-TK/GCV-Suizidsystem mehrfach eine signifikante Hepatotoxizität festgestellt werden konnte (van der EB et al. 1998, Brand et al. 1997), bestärkte die Entscheidung für das in dieser Arbeit verwendete HCC-Tumormodell, die bCD als Suizidprotein zu verwenden.

Als zellpermeabilitätsvermittelnde Sequenz für die Fusion mit der bakteriellen Cytosin Desaminase wurde das mit 12 aa sehr kleine HBV-*TLM*-Motiv aus der PräS2-Region der Hepatitis B Virus Oberflächenproteine ausgewählt. Dieses ist in der Lage, fusionierte Peptide, Proteine und Nukleinsäuren passiv, energie- und rezeptorunabhängig durch biologische Membranen zu transportieren und zeichnet sich durch eine sehr geringe Immunogenität aus. Da sich die durch das HBV-*TLM* vermittelte Zellpermeabilität nicht nur auf Leberzellen beschränkt, ist ein Einsatz bei vielen malignen Erkrankungen gut vorstellbar.

Generierung von zellpermeablen Suizidproteinen

Um die Fusionproteine, bestehend aus dem HBV-*TLM* und dem bakteriellen Enzym Cytosin Desaminase, hinsichtlich ihrer strukturellen Voraussetzungen und der enzymatischen Funktionalität als sog. Suizidproteine untersuchen zu können, wurden zunächst prokaryontische Expressionsplasmide kloniert und zur Expression gebracht. In der Literatur ist ein relativ aufwendiges Verfahren zur Expression und Reinigung des bakteriellen Enzyms beschrieben. Bei diesem erstmals von Porter et al. 1993 angewandten Verfahren wurde die bakterielle Cytosin Desaminase aus *E.coli* durch Kombination von Ionenaustausch-Chromatographie, einer Hitzedenaturierung mit anschließender Ammoniumsulfatfällung und Renaturierung sowie einer Gelfiltrationschromatographie gewonnen, wobei jedoch ein Ausbeuteverlust von ca. 95% (!) hinsichtlich der gereinigten Proteinmenge auftrat. Um rekombinante Proteine effizienter zu reinigen, kann durch Genfusion eine Proteindomäne angefügt werden, die eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie erlaubt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem ausgewählt, bei dem durch das Fusionieren eines sehr kleinen „Tags“ an das Zielprotein eine zeitsparende und effiziente Affinitätschromatographie mit hohen Proteinausbeuten bei gleichzeitig vorhandener Enzymaktivität möglich wurde. Für die Herstellung der prokaryontischen Expressionsplasmide wurden Klonierungsvektoren verwendet, die an die Expressionskonstrukte einen 18 Aminosäuren kleinen poly-His-Tag anfügen. Dieser 6His-Tag ermöglicht nach der Expression der Gene die affinitätschromatographische Reinigung der Fusionsproteine durch seine Wechselwirkung mit Nickel-Nitrilotriacetat. Der Vorteil der Ni-NTA-Metallchelat-Affinitätschromatographie gegenüber anderer Reinigungsverfahren liegt darin, dass mit sehr wenigen Reinigungsschritten Proteine mit einer Reinheit von mehr als 95% isoliert werden können (Janknecht et al., 1991).

Um zu untersuchen, ob die Positionierung des HBV-*TLM* an die rekombinanten Fusionsproteine für die Synthese und Zellpermeabilität von Bedeutung ist, wurden Fusionskonstrukte hergestellt, die das HBV-*TLM* entweder fusioniert am C- oder N-Terminus des Suizidgens enthielten. Diese Konstrukte sowie zusätzlich die codierende Sequenz für das wt-Protein wurden mit Klonierungsvektoren ligiert, die entweder amino- oder carboxyterminal den 6His-Tag anfügen. Die Expressionsanalyse der carboxyterminal 6His-anfügenden Plasmide ergab nach

Zugabe des vektorspezifischen Induktors eine Überexpression bei dem Suizidgen mit C-terminal fusioniertem HBV-*TLM* (bCDTLM6His). Im Lysat der induzierten Zellen, die Suizidproteine mit N-terminal fusioniertem HBV-*TLM* (TLMbCD6His) synthetisieren sollten, konnte dagegen in der SDS-Gel-elektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung keine Proteinsynthese detektiert werden. Erst mittels proteinspezifischer Western-Blot-Analyse konnte auch hier die Expression des Fusionskonstruktes nachgewiesen werden, wobei die Proteinausbeuten deutlich unter denen des Suizidproteins mit C-terminalem HBV-*TLM* und des wt-Proteins lagen. Ursache für die niedrigen Ausbeuten könnte in diesem Fall ein proteolytischer Abbau des heterologen Fusionsproteins mit N-terminal fusioniertem HBV-*TLM* sein, da insbesondere Modifikationen der aminoterminalen Aminosäure zu Veränderungen der biologischen Halbwertszeit des jeweiligen Proteins führen können. Eine Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem angefügtem 6His konnte ebenfalls für keines der Fusionskonstrukte in der SDS-Gel-Analyse gezeigt werden. Offensichtlich beeinflusst die Fusion von Sequenzen am N-Terminus der Cytosin Desaminase auch hier die Biosynthese rekombinanter Proteine.

Nach der Lyse der proteinsynthetisierenden Bakterien konnten mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus Induktionskulturen wt-Proteine und Proteine mit C-terminalem HBV-*TLM* im mg-Bereich gewonnen werden. Um annähernd gleiche Mengen des bCD-Fusionsproteins mit N-terminalem HBV-*TLM* gewinnen zu können, mussten Induktionskulturen mit doppeltem Ansatzvolumen durchgeführt werden. Die Überprüfung der Reinheit der affinitätsgereinigten Proteine mittels Silberfärbung ergab eine ausreichende Reinheit für weitere Untersuchungen. Zusätzliche Reinigungsschritte, die mit Ausbeuteverlusten hinsichtlich Menge und Enzymaktivität hätten verbunden sein können, konnten somit entfallen.

Herstellung bCD-spezifischer, polyklonaler Antikörper

Für die Gewinnung von Antiseren wurden Kaninchen mit gereinigten Fusionsproteinen unter Einsatz von Adjuvanzen immunisiert. Untersuchungen zur Spezifität des resultierenden Antiserums ergaben eine Vielzahl verschiedener Antikörper mit unterschiedlicher Epitopspezifität und -affinität, die das Antigen in fast allen Konformationen, selbst nach Denaturierung oder Fragmentierung, erkannt-

ten. Um die Spezifität für eine eindeutige Identifizierung der bCD-Fusionsproteine zu erhöhen, wurde das Antiserum über eine Antigen-gekoppelte Affinitätsmatrix chromatographisch gereinigt. Dabei erfolgte die Anreicherung von Antikörpern, die das Antigen ausschließlich in seiner vollen Länge sehr spezifisch erkennen. Die affinitätsgereinigte Antikörper-Lösung wurde für den proteinspezifischen Nachweis sowohl in der Western-Blot-Analyse als auch für die indirekte Markierung von Antigen eingesetzt.

Strukturelle Voraussetzungen für enzymatische Aktivität der heterologen bCD-Fusionsproteine

Die Untersuchung zu den strukturellen Voraussetzungen für eine enzymatische Aktivität der Fusionsproteine erfolgte über die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Standardkurve von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Für die drei Fusionsproteine wurde jeweils ein Molekulargewicht von ca. 300 kD ermittelt. Bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kD würde dies einer Hexamerisierung der Fusionsproteine entsprechen. Tatsächlich ergaben Untersuchungen zur Quartärstruktur der bakteriellen Cytosin Desaminase (Ireton et al., 2001), dass das Enzym in seiner nativen Form als Hexamer vorkommt, welches Voraussetzung für eine katalytische Aktivität ist. Dabei lagert sich ein Proteinmonomer, welches aus einem klassischen α/β -*barrel* und einer kleinen β -Faltblattdomäne besteht, mit einem zweiten Monomer zu einem homologen Dimer zusammen. Drei Dimere bilden dann die native Form der bakteriellen Cytosin Desaminase als Proteinhexamer mit einer Größe von ca. 300 kD. Entscheidende Bedeutung bei der Bildung der Quartärstruktur scheint die β -Faltblattdomäne zu haben, die sich am Ende des *barrels* distal vom aktiven Zentrum befindet und aus zwei Peptid-Segmenten von den entgegengesetzten Enden der primären Enzymsequenz zusammengesetzt wird (Ireton et al., 2002). Ein hemmender Einfluss auf die Ausbildung der Quartärstruktur des Enzyms, bedingt durch eine endständige Fusion im Bereich der für eine Dimerisierung essentiellen β -Faltblattdomäne, konnte im Falle des HBV-*TLM* für keines der bCD-Fusionsproteine nachgewiesen werden.

Enzymatische Aktivität von Fusionsproteinen

Voraussetzung für einen Einsatz der bakteriellen Cytosin Desaminase in der Suizidgentherapie ist die enzymatische Aktivität und Stabilität des Enzyms. Das endogene Enzym, welches in mammalen Zellen nicht gefunden wird, katalysiert im Nukleotidstoffwechsel von Bakterien die Umsetzung von Cytosin zu Uracil. Um zu überprüfen, ob die prokaryontischen, mit HBV-*TLM*-fusionierten Suizidproteine ebenfalls in der Lage sind, die Umsetzung von Cytosin bzw. 5 Fluorcytosin zu katalysieren, wurde ein Verfahren benötigt, welches mit geringem Aufwand genaue und reproduzierbare Ergebnisse liefert. In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Messung der enzymatischen Aktivität des Enzyms beschrieben. So verfolgten z.B. Adachi et al., 2000 den enzymatischen Umsatz von 5FC mit einem HPLC-Verfahren oder Dong et al., 1996 und Miller et al., 2002 analysierten den Umsatz von radioaktivem 5FC. Besonders häufig wird aber auch die photometrische Messung der Änderung der Lichtabsorption genutzt (Austin and Huber, 1992, Porter und Austin, 1993, Kuriyama et al. 1999), die sich aus der Umsetzung des spezifischen Substrates Cytosin ergibt. Da für den Nachweis der Enzymaktivität nach sich oft wiederholenden Proteinaufreinigungen ein schnell durchzuführendes Verfahren benötigt wurde, erfolgte die Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität der rekombinanten Fusionsproteine in dieser Arbeit über die Messung der Abnahme der Lichtabsorption bei 286 nm nach einem von Porter und Austin, 1993 beschriebenen Verfahren. Für prokaryontisch synthetisiertes, gereinigtes wt-Protein konnten die Autoren in ihren Arbeiten eine spezifische enzymatische Aktivität von 105 U/mg Protein nach 5-stufiger Reinigung nachweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der vorliegenden Arbeit nach einstufiger Reinigungsstrategie erreicht. Die ermittelte, spezifische Enzymaktivität lag für alle Fusionsproteine zwischen 85-100 U/mg Protein, wobei die Aktivitäten zwischen den verschiedenen Aufreinigungen schwankten. Dies lässt sich vermutlich auf eine Inaktivierung der Proteine durch die Oxidation des enzymgebundenen, für die Funktionalität des Metalloenzym notwendigen Fe^{2+} zu Fe^{3+} , zurückführen, wie sie bereits von Porter und Austin, 1993 bei längerer Lagerung beobachtet wurden. Sie konnten in ihrer Arbeit jedoch nachweisen, dass ein Verlust der katalytischen Aktivität durch die Zugabe von FeSO_4 rekonstituiert werden kann, was zu einer bis zu 95% wiederhergestellten Ausgangsaktivität des Enzyms führt. Dies war bei den verwendeten

bCD-Fusionsproteinen in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht notwendig, da die nachgewiesenen, in etwa vergleichbaren Aktivitäten lediglich dem Nachweis der Funktionalität der Proteine dienen.

Da sich der für Bestimmung der enzymatischen Aktivität der prokaryontischen Proteine verwendete photometrische Test als unzureichend sensitiv für eukaryontisch synthetisierte Fusionsproteine erwies, wurde zusätzlich ein HPLC-Verfahren für den Nachweis des katalytischen Umsatzes von Cytosin zu Uracil etabliert. Es erwies sich als ausreichend sensitiv, um geringste Mengen Uracil zu detektieren. Das Verfahren wurde gleichermaßen für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität gereinigter prokaryontischer Proteine als auch für den Nachweis eines enzymatischen Umsatzes in Gesamtzelllysat von transfizierten Hepatomzellen sowie im Zellkulturüberstand nach Translokation zellpermeabler bCD-Fusionsproteine genutzt.

Translokation prokaryontischer, zellpermeabler bCD-Fusionsproteine

Internalisierungsexperimente mit anschließender differentieller Zentrifugation zur Auftrennung des Lysates in einzelne Zellfraktionen und nachfolgender Western-Blot-Analyse haben gezeigt, dass das prokaryontische bCD-Fusionsprotein mit carboxyterminal fusioniertem Translokationsmotiv nach externer Zugabe in der Lage ist, die Zellmembran von Hepatomzellen zu überwinden und in Tumorzellen zu translokalisieren. Wesentlich geringere Proteinmengen konnten aber auch in der cytosolischen Fraktion von Zellen, die mit wt-Protein inkubiert wurden, nachgewiesen werden. Diese internalisierte wt-Proteinmenge ließ sich auch nicht durch unspezifische Wechselwirkungen oder Verschleppungen von lysierten Hepatomzellen begründen, da bei dem Fusionsprotein mit aminoterminal fusioniertem Translokationsmotiv in keiner der analysierten Zellfraktionen internalisiertes Protein gefunden werden konnte. Der Mechanismus für die Aufnahme des wt-Proteins konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Auch aus der Literatur sind nur wenig konkrete Untersuchungen zur Zellpermeabilität des wt-Proteins bekannt. Wybranietz (2001) konnte jedoch bei Versuchen zum interzellulären Transport von eukaryontisch synthetisierten bCD-Fusionsproteinen in der indirekten Immunfluoreszenz keine Translokation des wt-Proteins beobachten. Das auch in der vorliegenden Arbeit mittels Immunfluoreszenzmikroskopie trotz des Nachweises in der Western-Blot-Analyse keine

signifikanten Mengen internalisierten prokaryontischen wt-Proteins in den Hepatomzellen nachgewiesen wurden, könnte ein Indiz für die Nichteignung des gewählten Verfahrens für den Nachweis sehr geringer Proteinmengen oder für mangelnde Antikörpersensitivität sein. Eine Translokation des Fusionsproteins mit aminoterminal fusioniertem HBV-*TLM* konnte nach intrazellulärer Markierung wie auch in der Western-Blot-Analyse nicht beobachtet werden. Ausschließlich eine carboxyterminale Fusion des HBV-*TLM* scheint dem Fusionspartner bCD eine verstärkte Fähigkeit zur Zellpermeabilität zu verleihen, so dass ein Nachweis der Translokation in Tumorzellen möglich wird. Eine aminoterminal Modifikation scheint dagegen nicht zu einem verbesserten Transportverhalten der bCD-Fusionsproteine zu führen. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kam auch Wybranietz, 2001, der bei Fusion des Strukturproteins VP22 aus der Tegument-Region des Herpes simplex-Virus an die bakterielle Cytosin Desaminase nach eukaryontischer Expression eine deutliche Steigerung der interzellulären Transfer-Effizienz ausschließlich nach carboxyterminaler Fusion des VP22 beobachtete, während bei einer aminoterminalen Fusion des Proteins kein Transport detektiert werden konnte. Auch hier führte die N- oder C-terminale Verknüpfung von Protein-Domänen zu einem jeweils unterschiedlichen Transferverhalten. Um dieses Verhalten erklären zu können, wurden die Strukturen der Fusionsproteine mittels *molecular modeling* erstellt. Als Grundlage diente die von Ireton et al., 2001 ermittelte Struktur eines Monomers der Cytosin Desaminase, an deren N- bzw. C-Terminus die jeweiligen Sequenzen für das α -helikale HBV-*TLM* und den 6His-Tag angefügt wurden.

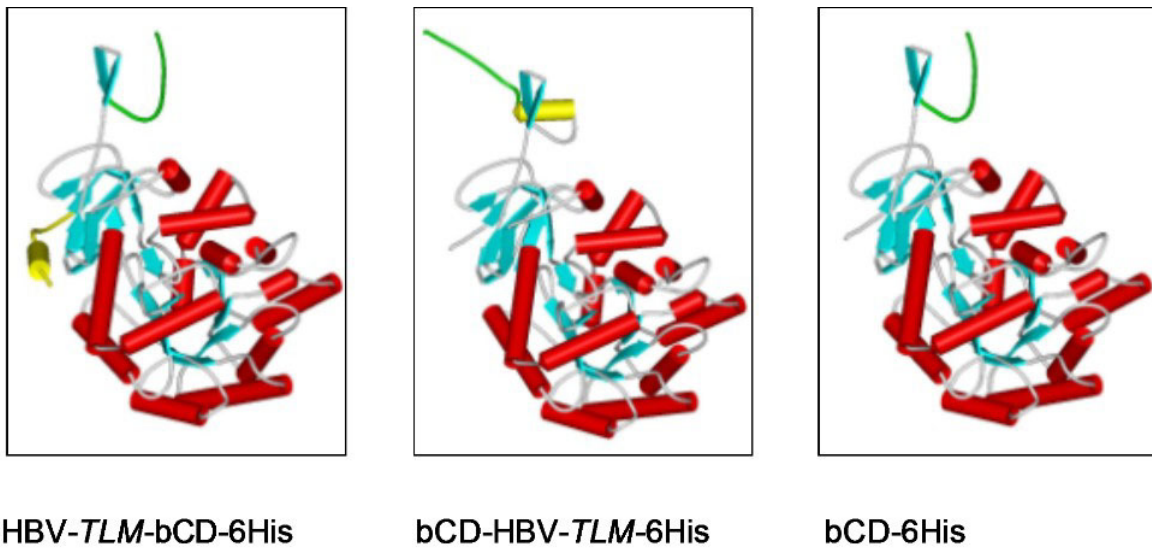


Abb. 33 Modellierung der Quartärstruktur von Monomeren der prokaryontischen Fusionsproteine β -Faltblätter (hellblau), α -Helices (rot), HBV-*TLM* (gelb), 6His-Tag (grün)

Auffällig, wie in Abb. 33 gezeigt, ist die gute Zugänglichkeit des C-Terminus der Proteine, der frei aus der Struktur der Fusionsproteine herausragt. Selbst bei einer Fusion des kombinierten HBV-*TLM*-6His an die Cytosin Desaminase sind sowohl die Zellpermeabilität vermittelnde Sequenz HBV-*TLM* als auch der 6His-Tag gut erreichbar. Dagegen ist eine N-terminal fusionierte Sequenz nur bedingt zugänglich. Berücksichtigt man zusätzlich, dass zwei der dargestellten Monomere in natürlicher Umgebung dimerisieren und sich anschließend mit zwei weiteren Proteindimeren zu einem kompakten Proteinhexamer zusammenlagern, erscheinen aminoterminal fusionierte Domänen wesentlich schlechter zugänglich als carboxyterminal fusionierte Sequenzen, die aus der β -Faltblattdomäne des Proteins herausragen. Eine eingeschränkte Zugänglichkeit des HBV-*TLM* am N-Terminus des Enzyms wäre daher eine Erklärung für das veränderte Transferverhalten dieses Fusionsproteins.

Lokalisation des zellpermeablen bCD-HBV-*TLM*-Fusionsproteins

Durch die Analyse einzelner Zellfraktionen der mit bCD-HBV-*TLM* inkubierten Hepatomzellen konnte eine cytosolische Lokalisation des zellpermeablen Fusionsproteins festgestellt werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine Immunfluoreszenzanalyse am konfokalen Laserscanmikroskop durchgeführt,

welches eine reale dreidimensionale Auflösung zellulärer Strukturen ermöglicht. Dabei bestätigte sich eine gleichmäßige Verteilung des translokalisierten Proteins im Cytosol der Zellen. Der Zellkern der inkubierten Zellen blieb ausgespart. Eine Akkumulation des Proteins als Hinweis auf eine Wechselwirkung mit bestimmten Zellstrukturen konnte nicht beobachtet werden. Eine HBV-*TLM* vermittelte Internalisierung des zellpermeablen Fusionsproteins bCD-HBV-*TLM*-6His konnte bei allen mikroskopierte Zellen nach 30 minütiger Inkubation beobachtet werden, so dass von einem sehr effizienten Transfer des Fusionsproteins, vermittelt durch das HBV-*TLM*, ausgegangen werden kann.

Stabile Transfektion von hepatozellulären Karzinomzellen

Für physiologische Experimente zur Charakterisierung und Untersuchung der Zellpermeabilität von bCD-Fusionsproteinen wurden humane Hepatomzellen über liposomale Transfektion mit eukaryontischen Expressionsplasmiden, die Transgene für verschiedene zellpermeable Fusionsproteine enthielten, transfiziert und mittels Genitacin selektioniert. Über ein in der Literatur beschriebenes Verfahren, das Picken einzelner Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze, wurden die Zellen vereinzelt. Die genomische DNA der erzeugten Zellen wurde auf die stabile Integration des Transgens mittels PCR mit konstruktsspezifischen Primern überprüft. Bei allen Zellpopulationen konnte die Integration des Transgens ins Genom nachgewiesen werden. Die Western-Blot-Analyse auf stabile Expression der Transgene ergab die Synthese aller Fusionsproteine. Als Ursache für die detektierten Unterschiede in den nachweisbaren Proteinmengen wurde eine unterschiedlich stark ausgeprägte HBV-*TLM* vermittelte Zellpermeabilität und ein damit verbundener Transport der synthetisierten Proteine in das umliegende Medium vermutet. Der Nachweis translokalisierter Fusionsproteine im Zellkulturüberstand ist allerdings in der vorliegenden Arbeit mit dem verwendeten Antikörper in der Western-Blot-Analyse auch nach Konzentrierung nicht gelungen, was an einer zu geringen Konzentration der translokalisierten Proteine gelegen haben könnte. Bei der Untersuchung der stabil transfizierten Hepatomzellen auf intrazellulär markierte Fusionsproteine mittels Fluoreszenzanalyse und FACS konnten signifikante Proteinmengen nur bei dem Protein mit aminoterminalen HBV-*TLM* nachgewiesen werden, was jedoch den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse sowie den nachfolgend diskutierten Ergebnissen zur enzymatischen Ak-

tivität in den transfizierten Hepatomzellen widerspricht. Aber auch bei mit HBV-*TLM*-bCD-6His transfizierten Zellen waren nicht alle Zellen dieser Population homogen angefärbt. So konnte eine geringe Anzahl von Zellen mit sehr intensiv gefärbtem Cytoplasma detektiert werden, wohingegen ein Teil der Zellen völlig ungefärbt erschien. Dies bestätigte sich auch in der FACS-Analyse, wo ca. 5% der mit HBV-*TLM*-bCD-6His stabil transfizierten Zellen überdurchschnittlich stark gefärbt erschienen, der Hauptanteil jedoch ungefärbt analysiert wurde. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie und der FACS-Analyse lassen, wie schon bei den Versuchen mit prokaryontischen Fusionsproteinen, vermuten, dass die affinitätsgereinigten Antikörper nicht ausreichend sensitiv sind, um geringe Mengen Fusionsprotein intrazellulär zu markieren. Eine für die intrazelluläre Markierung zu geringe Sensitivität der Antikörperlösung erklärt jedoch nicht die beobachtete Inhomogenität der mit HBV-*TLM*-bCD-6His transfizierten Zellen, so dass bei diesen Zellen von einer sehr heterogenen Proteinexpression oder dem teilweisen Verlust des Transgens ausgegangen werden muss, wie er bereits von Bentires-Alj et al. 2000 diskutiert wurde. Da jedoch auch die Selektion eines Mischklons nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, bei dem es bei einem Teil der transfizierten Zellen zu einer Mehrfachintegration des Transgens oder zur Integration hinter einem starken Promotor/Enhancer gekommen sein könnte, werden für Nachuntersuchungen derzeit neue stabile Zelllinien hergestellt, die über das *limited dilution*-Verfahren vereinzelt werden. Mit diesem Verfahren kann sichergestellt werden, dass die selektionierten Zellen tatsächlich aus einer transfizierten Zelle hervorgegangen sind. Sollte eine Beurteilung der Homogenität der neu erzeugten Zellklone mit dem Antikörper wieder nicht möglich sein, so sollte zumindest eine Analyse der Zellen mittels FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) auf genomischer Ebene Aufschluss über eine gleichmäßige Integration des Transgens in das Genom der transfizierten Zellen geben. Um eine Option für den klassischen Nachweis einer interzellulären Ausbreitung – den Nachweis des *spreadings* in Zellmischungsexperimenten mittels indirekter Immunfluoreszenz – zu haben, muss im weiteren Verlauf des Projektes über die Optimierung des Fixierungsverfahrens bei der intrazellulären Markierung versucht werden, die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers zu erhöhen. Um trotzdem erste Aussagen zur Potenzierung der Suizidgenwirkung durch eine HBV-*TLM* vermittelte Zellpermeabilität der Fusionsproteine im Zellkultursystem

treffen zu können, wurden die transfizierten Zellen dennoch für weitere Versuche verwendet. Die im Folgenden getroffenen Aussagen sind jedoch vor dem Hintergrund zu beurteilen, dass eine Homogenität der Zellen hinsichtlich der Proteinexpression, evtl. bedingt durch den Verlust des Transgens oder aber der Selektionierung als Mischklon, nicht nachgewiesen werden konnte.

Cytotoxizität von 5FC auf genetisch veränderte Hepatomzellen

Da eine Expression der Fusionskonstrukte über die Western-Blot-Analyse bereits nachgewiesen wurde, sollte nachfolgend die intrazelluläre Suizidgenwirkung der Fusionsproteine mittels Cytotoxizitätsassay untersucht werden. Dazu wurde den Zellen 5FC als *prodrug* in einer nichttoxischen Konzentration zugesetzt und das Wachstum der Zellen verfolgt. Eine Quantifizierung der Hemmung des Zellwachstums nach Administration der *prodrug* 5FC ermöglichte der Farbstoff Sulforhodamin B, der an zelluläre Proteine bindet und so eine Abnahme der Zellproliferation dokumentieren kann. Die antiproliferative Wirkung des gebildeten 5FU beruht dabei hauptsächlich auf der Hemmung des Enzyms Thymidilatsynthase, das Nukleotidbausteine für die DNA-Synthese bereitstellt. Außerdem werden cytotoxische Effekte durch den Einbau von 5FU-Metaboliten in DNA und RNA erzielt, so dass in den schnell proliferierenden Tumorzellen eine Hemmung des Zellwachstums erreicht werden kann.

Das Wachstum der parentalen Hepatomzellen, die das 5FC nicht umsetzen können, wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 0,2 mM kaum beeinflusst. Über diesen Bereich hinaus war jedoch auch bei den parentalen Hepatomzellen mit steigender 5FC-Konzentration eine zunehmende Wachstumsinhibierung zu beobachten. Dies war insofern erstaunlich, da Wybranietz, 2002, bei Untersuchungen mit Rattenhepatomzellen bis zu einer Konzentration von 10 mM 5FC und Kuriyama et al. 1999 bei Versuchen am murinen HCC-Modell im Konzentrationsbereich von 0-1 mM 5FC keine Beeinflussung des Wachstums feststellen konnten. Im Vergleich dazu zeigten Gliomzellen bei einer Konzentration von 0,1 mM bereits erste Anzeichen für ein eingeschränktes Wachstum (Dong et al. 1996). Dies macht deutlich, dass die Empfindlichkeit gegenüber der *prodrug* stark von der verwendeten Zelllinie abhängt und nicht generell davon ausgegangen werden kann, dass 5FC auf mammale Zellen nicht cytotoxisch wirkt bzw. alle Zellen dieselbe Sensitivität gegenüber 5FC aufweisen (Miller et al.

2002). Der nicht toxische Konzentrationsbereich muss daher für jedes Modellsystem neu bestimmt werden. Die Expression der Suizidgene bCD und bCD-HBV-*TLM* führte bei den transfizierten Zellen zu einer deutlichen Inhibierung des Wachstums mit steigender *prodrug*-Konzentration. Dies lässt auf eine Desaminierung der *prodrug* durch aktive Suizidproteine schließen. Die Konzentration, die nötig war, um mit 5FC eine 50%ige Wachstumsinhibierung (IC₅₀) zu erreichen, lag bei beiden Zellpopulationen bei ca. 0,025 mM. Eine Beeinflussung der Funktionalität durch die carboxyterminale Fusion des zellpermeablen Peptids konnte durch die nachgewiesene, vergleichbare Funktionalität des Fusionsproteins mit der des wt-Proteins ausgeschlossen werden. Die notwendige Konzentration an 5FC zur Eliminierung von 50% der Zellen konnte dabei um das ca. 40fache gegenüber den parental Zellen verringert werden. Eine Suizidgenwirkung konnte für diese beiden transfizierten Zellpopulationen eindeutig nachgewiesen werden. Obwohl eine Proteinsynthese auch bei den Zellen, die HBV-*TLM*-bCD exprimieren, gezeigt wurde, konnte eine vergleichbare Wachstumshemmung bei diesen Zellen nicht beobachtet werden. Eine 5FC-Konzentration von 0,025 mM führte bei diesen Zellen lediglich zu einer 10%igen Wachstumshemmung. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die HPLC-Analyse von Zelllysaten der transfizierten Zellen nach Zusatz von Cytosin. Während die Lysate von Hepatomzellen, die bCD und bCD-HBV-*TLM* enthalten, eine vollständige Umsetzung des Substrates ermöglichten, wurde im Lysat der Zellen mit aminoterminalen HBV-*TLM* weniger als die Hälfte des Cytosins umgesetzt. Ursache für die eingeschränkte enzymatische Aktivität dieses Fusionsproteins könnte ähnlich wie bei dem prokaryontischen Fusionsprotein mit aminoterminal fusionierten HBV-*TLM* eine negative strukturelle Beeinflussung durch das Anfügen des HBV-*TLM* an den N-Terminus sein.

Nachweis der verstärkten Zellpermeabilität der HBV-*TLM*-Suizidproteine

Da mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper ein klassischer Nachweis des interzellulären Transports von HBV-*TLM*-Fusionsproteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz in Zellmischungsexperimenten nicht durchgeführt werden konnte, erfolgte der Nachweis einer funktionalen, HBV-*TLM* vermittelten Zellpermeabilität über den Nachweis einer enzymatischen Aktivität translokalisierter Fusionsproteine im Zellkulturüberstand von transduzierten Tumorzellen. Dabei wur-

de die Bildung von Uracil nach dem Zusatz von Cytosin zum ZKÜ bestimmt. Eine mittels HPLC nachgewiesene Desaminierung des Cytosins lieferte einen eindeutigen Nachweis des Transfers katalytisch aktiver Enzyme aus den mit bCD-HBV-*TLM* transduzierten Zellen in das umliegende Medium und stellt die Voraussetzung für das postulierte *spreading* in die nicht transduzierten Zellen dar. Aber auch bei den wt-Protein-produzierenden Tumorzellen konnte eine deutliche enzymatische Aktivität im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, die für eine zumindest teilweise Sekretion des Proteins in das umliegende Medium spricht. Im Gegensatz dazu beschrieben Kuriyama et al. 1998, dass sie im Lysat von murinen HCC-Zellen, die mit bCD transduziert wurden, eine 20fach höhere bCD-Aktivität nachweisen konnten als im Zellkulturüberstand. Das führte zu der Aussage, dass das wt-Enzym nicht in das Medium sekretiert wird, sondern in den Zellen verbleibt. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch Hinweise auf eine teilweise Internalisierung von prokaryontisch synthetisiertem wt-Protein gewonnen werden. Ein HBV-*TLM* unabhängiger Transfer des wt-Proteins, dessen Effizienz jedoch geringer als nach carboxyterminaler Fusion des HBV-*TLM* an die bCD ist, kann somit nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden.

Ein enzymatischer Umsatz im Überstand der mit HBV-*TLM*-bCD transduzierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Ursache dafür könnte ähnlich wie bei den prokaryontisch synthetisierten Fusionsproteinen, eine eingeschränkte Zugänglichkeit des HBV-*TLM* am N-Terminus des Fusionsproteins sein. Obwohl eine Proteinsynthese in den transfizierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden konnte, scheint die aminoterminaler Fusion des HBV-*TLM* an die bCD nicht die Fähigkeit zum verstärkten Austransport aus den produzierenden Zellen zu vermitteln. Hinzu kommt, dass bereits im Lysat dieser Zellen nur eine sehr geringe enzymatische Aktivität im Vergleich zu dem wt-Protein und dem Fusionsprotein mit C-terminalem HBV-*TLM* detektiert wurde, was auf eine eingeschränkte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des Enzyms zurückgeführt werden kann.

Mit dem Nachweis einer gegenüber dem wt-Protein gesteigerten Transfer-Effizienz des bCD-HBV-*TLM*-Fusionsproteins konnten jedoch die Voraussetzungen für ein postuliertes interzelluläres *spreading* des Fusionsproteins mit carboxyterminal fusioniertem HBV-*TLM* bestätigt werden, die einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen bieten. Um den Beweis für eine gegenüber dem wt-Protein verstärkte Ausbreitung des zellpermeablen Fusionsproteins bCD-HBV-

TLM in nicht transduzierte parentale Tumorzellen zu erbringen, werden deshalb in Kürze mit den neu generierten, stabil transduzierten HCC-Zellen Zellmischungsexperimente durchgeführt, die immunhistochemisch auf den Transfer der Fusionsproteine in die benachbarten Zellen untersucht werden. Zusätzlich soll mittels Cytotoxizitätsassay bzw. FACS-Analyse nach Propidiumjodid/AnnexinV-Färbung eine verstärkte Apoptosekapazität in Mischungsexperimenten nachgewiesen werden, die ebenfalls auf ein *spreading* des zellpermeablen Fusionsproteins zurückzuführen wäre.

Weiterführende Strategien und Ausblick

Mitbestimmend für die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber der Suizidgen-therapie mit bCD sind neben einer effizienten Umsetzung des *prodrugs* auch genetische Polymorphismen und die Pharmakokinetik des FU. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Aktivität der Dihydropyrimidinehydrogenase (DPD), ein in der Leber reichlich vorkommendes Enzym, welches über den Pyrimidinkatabolismus die verfügbare Menge an chemotherapeutisch wirksamen 5FU beeinflusst und 80 - 90% des 5FU in therapeutisch unwirksame Metaboliten umwandeln kann (Koyama et al. 2000, Gross et al. 2002, Longley et al. 2003, Kubota 2003). Die Aktivität der DPD ist dabei individuell verschieden. Eine geringe Aktivität erhöht den 5FU-Spiegel und kann zu einer verlängerten Aufenthaltsdauer von 5FU verbunden mit schweren Unverträglichkeiten, bis hin zu einem lethalen Ausgang der Therapie führen. Eine sehr hohe Aktivität ist für den Erfolg der Suizidgen-therapie ungünstig und führt zu Resistenzen gegenüber 5FU, die zusätzlich durch eine erhöhte Thymidilatsynthase-Aktivität in den Tumorzellen, die Suppression der Expression von Enzymen, die 5FU in seine aktiven Formen umwandeln und eine Erhöhung der Menge an endogenem Substrat der Thymidilatsynthase (dUMP), verstärkt werden können (Peters et al. 1995, Schneider et al. 2003). Eine Möglichkeit um möglichen 5FU-Resistenzen entgegen zuwirken, liegt in der Erhöhung der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber dem gebildeten 5FU. Das Enzym Uracilphosphoribosyltransferase (bUPRT), welches ebenfalls aus dem Nukleotidstoffwechsel von Bakterien stammt, kann das gebildete Uracil bzw. 5FU auf direktem Weg mit 5'-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat verknüpfen (Tiraby et al. 1998, Adachi et al. 2000, Koyama et al., 2000, Kawamura et al.

2001) und so die Bildung des aktiven 5FUMP katalysieren. Im Gegensatz zu den in mammalen Zellen für die weitere Umsetzung des Uracils bzw. 5FU genutzten Enzymen benötigt dieses Enzym initial keine sehr hohe Konzentration an 5FU und kann so die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber 5FU erhöhen (Tiraby et al. 1998, Adachi et al. 2000). Überträgt man das Gen für dieses *pyrimidine salvage enzyme* zusätzlich zum Cytosin Desaminase-Gen in Tumorzellen, so kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine verstärkte Sensitivität von Gehirn-, Kolon-, Magen-, Leber- und Pankreastumoren sowie Mammakarzinomen gegenüber 5FC beobachtet werden (Kanai et al. 1998, Tiraby et al. 1998, Koyama et al. 2000, Adachi et al. 2000, Kawamura et al. 2001, Chung-Faye et al. 2001, Miyagi et al. 2003, Porosnicu et al. 2003). Um die Vorteile einer Kombinationstherapie mit der bUPRT zur Verstärkung der Anti-Tumor-Wirkung der zellpermeablen Cytosin Desaminase nutzen zu können, wurden im Rahmen des vorliegenden Projektes bereits prokaryontische Expressionsplasmide subkloniert, welche das Gen für die bUPRT enthalten. Um möglichst viele Tumorzellen gegenüber dem gebildeten 5FU sensibilisieren zu können, wurde das bUPRT-Gen ebenfalls mit der Sequenz für das Zellpermeabilität vermittelnde HBV-TLM fusioniert. Derzeit wird an der Charakterisierung der zellpermeablen bUPRT gearbeitet, die eine vielversprechende Option für die Potenzierung der Suizidgenwirkung der zellpermeablen bCD darstellt.

Erste Erfolge bei der Verstärkung der Suizidwirkung in Tumorzellen wurden aber auch mit der Kombinationstherapie der synergistisch wirkenden Mechanismen des bCD/5FC-Systems mit HSV-TK/Ganciclovir-System verzeichnet (Aghi et al. 1998, Blackburn et al. 1998 und 1999, Uckert et al. 1998, Corban-Wilhelm et al. 2003). So konnten Rogulski et al. 1997 nachweisen, dass Gliosarcomzellen der Ratte nach Transduktion einer bDC-TK-Fusion 1000fach sensitiver gegenüber Ganciclovir (GCV) reagieren als bei der Monotherapie mit HSV-TK/GCV. Bei Implantation von retroviral mit bCD und TK transduzierten Brustkrebszellen in Mäusen konnte durch die Gabe von 5FC und GCV die Bildung von Tumoren vollständig verhindert werden (Uckert et al. 1998). Corban-Wilhelm et al. zeigten 2003 an Prostata-Tumorzellen der Ratte, die mit dem bifunktionalen Fusionsgen CDglyTK transfiziert wurden, dass bei Monotherapie mit 5FC 57% und mit GCV sogar 83% der Zellen überleben und ein vollständiges Absterben ausschließlich bei einer gleichzeitigen Administration beider *prodrugs* erzielt werden kann. Eine

zentrale Rolle für den Erfolg der kombinierten Anwendung dieser, in ihrem Mechanismus unterschiedlich wirkenden Strategien, scheint das zelleigene Thymidin zu spielen, welches mit denselben aktiven Bindungsstellen der HSV-TK interagiert wie das GCV. Aufgrund seiner sehr geringen Michaelis-Menten-Konstante ($0,2 \mu\text{M}$), die weit unter der intrazellulären Thymidin-Konzentration ($1\text{--}20 \mu\text{M}$) liegt, besetzt das dTTP die freien aktiven Bindungsstellen der HSV-TK (Harmenberg 1983, Chen et al. 1979). Es verhindert so die Bindung des Ganciclovirs, dessen K_m -Wert mit $100 \mu\text{M}$ wesentlich über der unter Therapie erreichten GCV-Plasmakonzentration von $45 \mu\text{M}$ und der noch geringeren intrazellulären GCV-Konzentration liegt (Faulds and Heel 1990, Chen et al. 1979). Die für die Suizidgenwirkung des HSV-TK/GCV-Systems notwendige initiale Phosphorylierung des Ganciclovirs, die den limitierenden Schritt in der Ganciclovir vermittelten Cytotoxizität darstellt (Markham and Faulds, 1994), wird demnach durch hohe Konzentrationen an zelleigenem Thymidin unterdrückt. Kombiniert man jedoch beide Anti-Tumor-Strategien, so erreicht man eine synergistische Verstärkung der Mechanismen (Aghi et al. 1998, Uckert et al. 1998), da das gebildete 5FU über die irreversible Hemmung der Thymidilatsynthase die *de novo* Synthese des dTMP hemmt und so die dTTP-Konzentration der transduzierten Zellen um bis zu 90% reduziert. Für die Bindung des Ganciclovirs bleiben so ausreichend freie aktive Bindungsstellen, um eine effektive Phosphorylierung der *prodrug* zu gewährleisten. Das phosphorylierte Ganciclovir kann dann anstelle von dGTP in die DNA eingebaut werden, wodurch es zum Kettenabbruch bei der DNA-Neusynthese kommt.

Ebenfalls diskutiert wird seit einigen Jahren die Bedeutung des immunologischen Effektes für den Erfolg der Suizidgentherapie. So konnten Huber et al. bereits 1993 eine Hemmung des Wachstums eines durch parentale humane Dickdarm-Karzinomzellen induzierten Xenographen im Mausmodell beobachten, der auf das extensive Absterben von bCD-transduzierten humanen Dickdarm-Karzinomzellen in der kontra-lateralen Flanke nach 5FC-Administration und einer daraus resultierenden Immunantwort zurückgeführt wurde. Auch wenn das bCD-Protein selbst immunogen ist (Consalvo et al. 1995), was einerseits die Herstellung bCD-spezifischer Antikörper möglich macht, so reicht andererseits die induzierte Immunität allein nicht aus, um eine Regression des Tumors oder die Inhibierung des Tumorwachstums zu initiieren. So kann es bei einer Mono-

therapie mit Suizidgenen nach Absetzen der Therapie zu einer Tumor-Remission bzw. Metastasierung kommen. Um eine synergistische, antitumorale Immunität in der Suizidgentherapie zu bewirken, müssen zusätzlich co-stimulierende Faktoren in den Tumorzellen zur Verfügung gestellt werden, die eine Rekrutierung von antigen-präsentierenden Zellen (APC) ermöglichen. Die stimulierten APCs können dann die durch die Suizidprotein-vermittelte Apoptose freigesetzten Tumorantigene so effektiv präsentieren, dass über die Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphozyten eine verstärkte antitumorale Immunantwort induziert wird. So gelang es Cao et al. 1999 und 2000 den antitumoralen Effekt von 5FC auf adenoviral-übertragene Colon-Karzinomzellen CT26/bCD im syngenem Mausmodell durch die Vorbehandlung mit den co-stimulierenden Faktoren GM-CSF (*granulocyten-macrophage colony stimulating factor*) und SFC (*stem cell factor*) deutlich zu steigern. Um eine solche synergistisch wirkende Immunität auch in der Suizidgentherapie mit zellpermeablen Fusionsproteinen induzieren zu können, wäre daher eine primäre, tumorzellspezifische Transduktion mit nicht zellpermeablen, immunstimulierenden Faktoren denkbar, die die Induktion einer Immunantwort ausschließlich auf die Tumorzellen, nicht jedoch auf das gesunde Gewebe, möglich macht.

Zu erwähnen bleibt, dass in jüngster Zeit an der Charakterisierung neuer Suizidgene, wie beispielsweise einer chemisch induzierbaren Caspase gearbeitet wird, die über das *bypassing* molekularer Mechanismen Apoptose in adenoviral transduzierten Prostatakrebszellen induzieren kann (Shariat et al. 2001, Xie et al. 2001) oder der Cytosin Desaminase aus *Saccharomyces cerevisiae* (γ CD), die trotz fehlender Sequenz-Homologie zur bCD eine bis zu 22fache erhöhte Umsetzung des 5FC ermöglicht und im Vergleich mit der bCD in C3H-Mäusen eine deutlich verbesserte antitumorale Wirkung zeigt (Kievit, E. 1999 and 2000, Ramnaraine et al. 2003).

Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., Tamaiya, T., Ichikawa, T., Terada, K., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Hamada, H. and Ohmoto, T.: 2000, Experimental Gen Therapy for Brain Tumors Using Adenovirus-Mediated Transfer of Cytosine Desaminase Gene and Uracil Phosphoribosyltransferase Gene with 5-Fluorocytosine. *Hum. Gene Ther.* **11**, S.77-89
- Aghi, M., Kramm, C.M., Chou, T.-C., Breakfield, X.O. and Chiocca, E.A.: 1998, Synergistic Anticancer Effects of Ganciclovir/Thymidine Kinase and 5-Fluorocytosin/Cytosine Deaminase Gene Therapies. *J.Nat.Canc.Inst.* **90**, S.370-380
- Allgaier, H.P., Zuber, I., Deibert, P., Becker, G. and Blum, H.E.: Hepatozelluläres Karzinom: Nicht-chirurgische Therapiemöglichkeiten. www.lebertransplantation.de. 2003
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J.: 1990, Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**(3), S.403-10
- Anderson S.C., Johnson, D.E. Harris, M.P. et al.: 1998, p53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus. *Clin. Cancer Res.* **4**, S.1649-1659
- Arbuthnot, P, Capovilla, A. and Kew, M.: 2000, Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: Effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated proteine kinase and Jak/Stat pathways. *J. Gastroenterology and Hepatology.* **15**, S.357-368
- Austin, E.A. and Huber, B.E.: 1992, A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Mol.Pharmacol.* **43**, S.380-387
- Baker, A.H.: 2003, Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol.* **25**(1), S.101/2

- Bentires-Alj, M., Hellin, A.-C., Lechanteur, C., Princen, F., Lopez, M., Fillet, G., Gie-len, J., Merville, M.-P. and Bours, V.: 2000, Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther.* S.20-26
- Benvegnú, L. and Alberti, A.: 2001, Patterns of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus and hepatitis C virus related cirrhosis. *Antiviral Research.* S.199-207
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW.: 1997, Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 275(5304), S.1320-3
- Birnboim, H.C. and Doly, J.: 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6), S.1513-23
- Blackburn, R.V., Galoforo, S.S., Corry, P.M. et al.: 1998, Adenoviral-mediated transfer of a heat inducible double suicide gene into prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, S.1358-1362
- Blackburn, R.V., Galoforo, S.S., Corry, P.M. and Lee, Y.J.: 1999, Adenoviral Transduction of a cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene into prostate carcinoma cells enhances prodrug and radiation sensitivity. *Int. J.Cancer.* 82, S.293-297
- Block, A., Milansinovic, D., Ameis, D., Chen, S.H. and Woo S.L.C: Promotorvergleich suizidgentherapeutischer Ansätze des Kolonkarzinoms mittels Cytosin-Desaminase exprimierender Adenoviren in vitro. Hrsg.: Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten: Leipzig., 1999
- Bradford, M.M.: 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, S.248-54
- Brandenburg, B.: Gentransfer unter Verwendung zellpermeabler, DNA bindender Fusionsproteine und zellpermeabler Nukleokapside. Hrsg.: Fakultät für Biologie, Chemie und Pharmazie. Freie Universität: Berlin, 2001

- Brandt, K. et al.: 1997, ner associated toxicity of the HSV-TK/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther.* 4, S.9-16
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., and Ozturk, M.: 1991, Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature.* 350, S.429-431
- Brown, N.L. and Lemoine, N.R.: 2004, Clinical trials with GDEPT: cytosine deaminase and 5-fluorocytosine. *Methods Mol Med.* 90, S.451-7
- Brunken, C., Steiner, P. and Rogiers, X.: 2000, Perkutane Ethanolinjektion (PEI) und Kryotherapie. *Der Internist.* 41, S.205-207
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. and Dobberstein, B.: 1987, A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymology.* 155, S.416-433
- Busuttil R.W. and Farmer G.D.: 1996, The surgical of primary hepatobiliary malignancy. *Liver Transplant Surg.* 2, S.114-130
- Cao, G, Kuriyama, S., Gao, J. Nakatani, T., Chen Q., Yoshiji, H., Zhao, L., Kojima, H. Dong, Y., Fukui, H. and Hou, J.: 2001, Gene therapy for hepatocellular carcinoma based on tumour selective suicide gene expression using the alpha-fetoprotein (AFP) enhancer and a housekeeping gene promotor. *Eur. J. Cancer.* 37, S.140-147
- Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W. and Hamada, H.: 1998, Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor bearing mice. *Gene Therapy.* 5, S.1130-1136
- Cao, X., Huang, X., Ju, W.D., Zhang, W., Hamada, H. and Wang, J.: 2000, Enhanced antitumoral effect of adenovirus-mediated cytosine deaminase gene therapy by induction of antigen-presenting cells through stem cell factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Gene Therapy.* 7, S.177-186

- Carrico, C. and Glazer, R.I.: 1979, Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res.* 39, S.3694-3701
- Chen, M.S., Walker, J. and Prussoff, W.H.: 1979, Kinetic studies of herpes simplex virus type 1-encoded thymidine and thymidilate kinase, a multifunctional enzyme. *J Biol. Chem.* 254, S.10747-53
- Chung-Faye, G.A., Chen, M.J., Green, N.K., Burton, A., Anderson, D., Mautner, V., Searle, P.F. and Kerr, D.J.: 2001, In vivo gene therapy for the colon cancer using adenovirus-mediated , transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther.* 8, S.1547-1554
- Colombo, M.: 1998, The natural history of hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology.* 45, S.1221-1225
- Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R and Ballmer-Hofer K.: 2003, Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 278(37):, S.35109-14
- Consalvo, M., Mullen, C.A., Modesti, A., Musini, P., Allione, A., Cavallo, F., Giovarelli, M. and Forni, G.: 1995, 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J.Immunol.* 154, S.5302-5312
- Corban-Wilhelm H, Becker G, Bauder-Wust U, Greulich D and Debus J.: 2003, Cytosine deaminase versus thymidine kinase: a comparison of the anti-tumor activity. *Clin Exp Med.* 3(3), S.150-6
- Corban-Wilhelm, H., Ehemann, V., Becker, G., Greulich, D., Braun, K. and Debus, J.: 2004, Comparison of different methods to assess the cytotoxic effects of cytosine deaminase and thymidine kinase gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 11(3), S.208-14

- Danos, O. and Mulligan, R.C.: 1988, Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci.* *85(17)*, S.6460-4
- Davis, B.R., Brown, D.B., Prokopishyn, N.L. and Yannariello-Brown, J.: 2000, Micro-injection-mediated hematopoietic stem cell gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.* *2(4)*, S.412-9
- Derossi, D. et al.: 1994, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem.* *269(14)*, S.10444-50
- Derossi, D., G. Chassaing and A. Prochiantz: 1998, Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* *8(2)*, S.84-7
- Di Bisceglie, A.M.: 1997, Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* *26*, S.34-38
- Domain, B., Mahony, W. and Zimmermann, T.: 1993, Transport of 5-fluoruracil into human erythrocytes. *Biochem.Pharmacol.* *46*, S.503-510
- Dong, Y., Wen, P., Manome, Y., Parr, M., Hirschowitz, A., Chen, L., Hirschowitz, E.A., Crystal, R., Weichselbaum, R., Kufe, D.W. and Fine, H.A.: 1996, In vivo replication-deficient adenovirus-mediated transduction of the cytosine deaminase gene sensitizes glioma cells to 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Ther.* *7*, S.713-720
- Dorange, F., El Mehdaoui, S, Pichon, C., Coursaget, P. and Vautherot, J.F.: 2000, Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *J Gen Virol.* *81(Pt 9)*, S.2219-30
- Elliott, G, and O'Hare, P.: 1997, Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* *88(2)*, S.223-33
- El-Serag, H.B. and Mason A.C.: 1999, Rising incidence of hepatocellular Carcinoma in the United States. *New Engl. J. Med.* *340*, S.745-750

- Engelhardt, J.F., Ye, X., Doranz, B. and Wilson, J.M.: 1994, Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci.* *91*(13), S.6196-200
- Farabaugh, P.J.: 1978, Sequence of lacI gene. *Nature.* *274*, S.765
- Fattovich, G., Giustina, G. and Degos, F.: 1997, Morbidity and mortality in compensated cirrhose type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* *112*, S.463-472
- Faulds, D. and Heel, R.C.: 1990, Ganciclovir. A Review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infection. *Drugs.* *39*, S.597-638
- Förstermann, U.: 2003, Gentherapie: Erste Erfolge – viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Deutsches Ärzteblatt.* *100*,6, S.A-314 / B-280 / C-270
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. and Trono, D.: 1995, HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell.* *83*(4), S.569-76
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D.: 1997, HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci.* *94*(18):, S.9825-30
- Ge, K., Xu, L., Zheng, Z., Xu, D., Sun, L. and Liu, X.: 1997, Transduction of cytosine deaminase gene makes rat glioma cells highly sensitive to 5-fluorocytosine. *Int J Cancer.* *71*(4), S.675-9
- Ghoshal, K. and Jacob, S.T.: 1994, Specific inhibition of preribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated 5-fluorouracil. *Cancer Res.* *54*, S.632-636
- Grem J.L.: 5-Fluoropyrimidines. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice.* Hrsg.: Chabner B.A., Longo, D.L.: Philadelphia, Lippincott., S.149-212, 1996 2nd ed.

- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfranccone, L., Peschle, C., Nolan, G.P. and Pelicci, P.G.: 1998, High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* *58*(1), S.14-9
- Gross E., Harbeck, N. and Kiechle M.: 2002, Analyse des Dihydropyrimidin Dehydrogenase-Gens zur Abklärung von 5-Fluorouracil Intoleranz. *TZM News.* *2*, S.1-4
- Großmann, M., Raper, S., Kozarsky, K., Stein, E., Engelhardt, J., Muler, D., Lupien, P. and Wilson J.: 1994, Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genetics.* *6*, S.335:341
- Grothey, A., Kegel, T., Demke, W. and Schmoll H.-J.: 2000, Systemische Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Der Onkologe.* *6*, S.327-335
- Hafner, A., Brandenburg, B. and Hildt, E.: 2003, Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO Rep.* *4*(8), S.767-73
- Hajri, A., Wack, S., Lehn, P., Vigneron, J.P., Lehn, J.M., Marescaux, J., and Aprahamian, M.: (2004, Combined suicide gene therapy for pancreatic peritoneal carcinomatosis using BGTC liposomes. *Cancer Gene Ther.* *11*(1), S.16-27
- Hanazaki, K., Kajikawa, S., Shimozawa, N., Mihara, M., Shimada, K., Hiraguri, M., Koide, N., Adachi, W. and Amano, J.: 2000, Survival and recurrence after hepatic resection of 386 consecutive patients with hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg.* *191*(4), S.381-8
- Harmenberg, J.: 1983, Intracellular pools of thymidine reduce the antiviral action of acyclovir. *Intervirology.* *20*, S.48-51
- Heller, L., Pottinger, C., Jaroszeski, M.J., Gilbert, R. and Heller, R.: 2000,) In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity. *Melanoma Res.* *10*(6), S.577-83

- Heukeshoven, J. and Dernick, R.: 1988, Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSytem Development Unit. I. Staining of sodium dodecylsulfat gels. *Electrophoresis*. 9(1), S.28-32
- Hildt, E.: Untersuchung der Struktur und Funktion des Hepatitis B-Virus Transaktivators MHBst. Hrsg.: Fakultät für Chemie und Pharmazie. Eberhard-Karls-Universität: Tübingen, 1995
- Hirschowitz, E.A. Ohwada, A.; Pascal, W.R., Russi, T.J. and Chrystal, R.G.: 1995, In vivo -mediated gene transfer of the Eschirichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorcytosine. *Hum. Gene Ther.* 6, S.1055-1063
- Hoganson, D.K., Batra, R.K., Olsen, J.C. and Boucher, R.C.: 1996, Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 56(6), S.1315-23
- Holder, J.W., Elmore, E. and Barrett, J.C.: 1993, Gap junctions function and cancer. *Cancer Res.* 53, S.3475-85
- Honda ,K., Sbisa, E. Tullo, A. et al.: 1998, p53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. *Br J Cancer.* 77, S.776-782
- Houghton, J. A., Harwood, F.G. and Tillman, D.M.: 1997, Thyminless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, S.8144-8149
- Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S:S:, Knick, V.C., Tibbels, K.S. and Richards, C.A.: 1993, In vivo antitumor activity of 5-fluorcytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.* 53, S.4619-4626
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S:T: and Good, S.S.: 1994, Metabolism of 5-fluorcytosine in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, S.8302-8306

- Hussain, S.A., Ferry, D.R., El-Gazzaz, G., Mirza, D.F., James, N.D., McMaster, P. and Kerr, D.J.: 2001, Hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology*. **12**, S.161-172
- Idilman, R., De Maria, N., Colantoni, A. and Van Thiel, D.H.: 1998, Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. **5**(5), S.285-99
- Ireton, G.C., Black, M.E. and Stoodard, B.L.: 2001, Crystallization and preliminary X-ray analysis of bacterial cytosine deaminase. *Acta Crystallog. sect. D*. **57**, S.1643-1645
- Ireton, G.C., McDermott, G., Black, M.E. and Stoodard, B.L.: 2002, The Structure of *Escherichia coli* Cytosine Deaminase. *J Mol Biol*. **315**(4), S.687-697
- Jackson, A., Friedman, S., Zahn, X., Engleka, K.A., Forough, R. and Maciag, T.: 1992, Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **89**, S.10691-10695
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A. and Stunneberg, H.G.: 1991, Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **88**, S.8972-76
- Kanai, F., Lan, K.-H., Shiratori, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Okudaira, T., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Nakabayashi, H., Tamaoki, T. and Omata, M.: 1997, In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer Res*. **57**, S.461-465
- Kanai, F., Kawakami, T., Hamada, H., Sadata, A., Yoshida, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Tateishi, K., Shiratori, Y. and Omata, M.: 1998, Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentration of 5-fluorouracil. *Cancer Res*. **58**, S.1946-1951
- Kawamura, K., Bahar, R., Namba, H., Seiniya, M., Takenaga, K., Hamada, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.: 2001, Bystander effect in uracil phosphoribosyltransferase/5-fluorouracil-mediated suicide gene therapy is correlated with the level of intercellular communication. *Int.J.Onc*. **18**, S.117-120

- Kew, M.C.: 1989, Tumor markers in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 4, S.373
- Kievit, E., Bershad, E., Ng, E., Sethna, P, Dev, I., Lawrence, T.S. and Rehemtulla, A.: 1999, Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* 59, S.1417-1421
- Kievit, E., Nyati, M. K., Ng, E., Stegman, L.D., Parsels, J., Ross, B.D., Rehetmtulla, A. and Lawrence, T.S.: 2000, Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts. *Cancer Res.* 60, S.6649-6655
- Kilk K, Magzoub M, Pooga M, Eriksson LE, Langel U and Graslund A: 2001, Cellular internalization of a cargo complex with a novel peptide derived from the third helix of the islet-1 homeodomain. Comparison with the penetratin peptide. *Bioconjug Chem.* 12(6), S.911-6
- Koike, K., Tsutsumi, T., Fujie, H., Shintani, Y. and Moriya, K.: 2002, Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology.* 62, S.29-37
- Kotin, R.: 1994, Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 5, S.793-801
- Koyama, F., Sawada H., Fujii, H., Hamada, H., Hirao, T., Ueno, M. and Nakano, H.: 2000, Adenoviral-mediated transfer of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) gene to modulate the sensitivity of the human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Eur. J. Canc.* 36, S.2403-2410
- Kubo, S., Nishiguchi, S., Hirohashi, K., Tanaka, H., Tsukamoto, T., Hamba, H., Shuto, T., Yamamoto, T., Ikebe, T. and Kinoshita H.: 1999, Clinical significance of prior hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 86(5), S.793-8
- Kubota, T.: 2003, 5-fluorouracil and dihydropyrimidin dehydrogenase. *Int J Clin Oncol.* 8(3), S.127-31

- Kuriyama, S., Kikukawa, M., Masui, K., Okuda, H., Nakatani, T., Sakamoto, T., Yoshiji, H., Fukui, H., Ikenaja, K., Mullen, C. and Tsujii, T.: 1999, Cytosine deaminase/5-Fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective Immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int. J. Cancer*. *81*, S.592-597
- Kuriyama, S., Mitoro, A., Yamazaki, M., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Akahane, T., Toyokawa, Y., Kojima, H. Okamoto, S. and Fukui, H.: 1999, Comparison of Gene therapy with the Herpes simplex Virus Thymidine Kinase Gene and the Bacterial Cytosine Deaminase Gene for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Scand. J Gastroenterol*. *10*, S.1033-1041
- Kuriyama, S., Musai, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fuki, H., Ikenaka, K. and Tsujii, T.: 1995, Bystander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. *22*, S.1838-1846
- Kuriyama, S., Musai, K., Kikukawa M. et al.: 1999, Complete cure of established murine hepatocellular carcinoma is achievable by repeated injections of retroviruses carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther*. *6*, S.525-533
- Kurozumi, K., Tamiya, T., Ono, Y., Otsuka, S., Kambara, H., Adachi, Y., Ichikawa, T., Hamada, H. and Ohmoto, T.: 2003, Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus. *J Neurooncol*. *66*(1-2), S.117-27
- Lal, S., Lauer, U.M., Wessels, J.T., Niethammer, D., Beck, J. and Schlegel, P.G.: 2000, Suicide Genes: Past, Present, and Future Perspectives. *Immunology Today*. *21*, S.48-54
- Lauer, U.M., Spiegel, M. Bitzer, M. Wybranietz, W.A., Groß, C.D., Prinz, F., Graepler, F., Neubert, W.J. and Gregor, M.: 1998, New strategies for the genetic therapy of primary liver carcinoma. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies*. *7*/6, S.567-571
- Laemmli, U.K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. *227*(259), S.680-685

- Lin, S.M. and Lin, D.Y.: 2003, Percutaneous local ablation therapy in small hepatocellular carcinoma. *Chang Gung Med J.* 26(5), S.308-14
- Lin-Lee, Y.-C., Nakuamura, S., Gandhi, S.A.C., Stüber, D., Burkot, T.R. and Kuo, M.T.: 2002, Prolonged Stability and Sustained Prodrug Cell Killing Activity Using Receptor-mediated Delivery of Malaria Circumsporozoite-Cytosin Deaminase Fusion Protein into Liver Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, S.461-467
- Livraghi, T.: 2003, Radiofrequency ablation, PEIT, and TACE for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 10(1), S.67-76
- Livraghi, T., Goldberg, S.N., Lazarroni, S. Meloni, F., Ierace, T. Solbiati, L. and Gazelle, G.S.: 2000, Hepatocellular carcinoma: radiofrequency ablation of medium und large lesions. *Radiology.* 214, S.761-768
- Llovet, J.M., Bustamante, J., Castells, A., Vilana, R., Ayuso, M. del C, Sala, M., Bru, C., Rodes, J. and Bruix, J.: 1999, Natural history of untreated non-surgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology.* 29(1), S.62-7
- Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G.: 2003, 5-Fluorouracil: Mechanism of action and clinical strategies. *Nature.* 3, S.330-338
- Magzoub, M., Kilk, K., Eriksson, L.E., Langel, U. and Graslund, A.: 2001, Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1512(1), S.77-89
- Markham, A. and Faulds, D.: 1994, Ganciclovir. An update of its Therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs.* 48, S.455-84
- Maynard J.E.: 1990, Hepatitis B.Global importance and need for control. *Vaccine.* 8, S.18-20
- McKnight, S.L.: 1980, The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Res.* 8, S.5949-5964

- Miller, C.R., Gustion, A.N., Buchsbaum, D.J, Vickers, S.M., Manne, U., Grizzle, W.E., Cloud, G.A., Diasio, R.B. and Johnson, M.R.: 2002,) Quantitation of Cytosine Deaminase mRNA by Real-Time reverse transcription Polymerase Chain Reaction: A Sensitive method for Assessing 5-Fluorocytosine Toxicity in Vitro. *Anal.Biochem.* *301*, S.189-199
- Miyagi, T, Koshida, K., Hori, O., Konaka, H., Katoh, H., Kitagawa, Y., Mizokami, A., Egawa, M., Ogawa, S., Hamada, H. and Namiki, M.: 2003, Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med.* *5*, S.30-37
- Modrow, S. Falke, D. und Truyen, U.: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003 2. Auflage
- Mohr, L., Geissler, M. and Blum, H.E.: 2002, Gene therapy for malignant liver disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* *2*(2), S.163-175
- Moolten, F.L.: 1994, Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* *1*(4), S.279-87
- Mullen, C.A., Kilstrup, M., and Blaese, R.M.: 1992, Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Nat. Acad. Sci.* *89*, S.33-37
- Mullen, C.A., Coale, M.M., Lowe, R. and Blaese, R.M.: 1994, Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res.* *54*, S.1503-1506
- Niederau, C., Lange, S., Heintges, T. et al.: 1998, Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology.* *28*, S.1687-1695
- Nita, M.E., Alves, V.A.F., Carrilho, F.J., Ono-Nita, S.K., Mello, E.S. and Gama-Rodrigues, J.J.: 2002, Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* *44*(1), S.39-48

- Oess, S.: Entdeckung und Charakterisierung eines neuen Zellpermeabilitätsvermittelnden Peptidmotives aus den Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus. Hrsg.: Fakultät für Chemie und Pharmazie. Ludwig-Maximilians-Universität: München, 2000
- Oess, S. and Hildt, E.: 2000, Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis B-virus surface antigens. *Gene Ther.* 7, S.750-758
- Ohwada, A., Hirschowitz, E.A. and Crystal, R.G.: 1996, Regional delivery of an adenovirus vector containing the Escherichia coli cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum. Gene Ther.* 7, S.1567-1576
- Ozturk, M.: p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet.* 338, S.35-44
- Pan, X., Li, Z.S., Xu, G.M., Cui, L. and Tu, Z.X.: 2003, Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas.* 26(3)
- Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Triest, B. Codacci-Pisanelli, G., Johnston, P.G., van Groeningen, C.J. and Pinedo H.M.: 1995, Thymidilate synthase and drug resistance. *Eur.J.Cancer.* 31A, S.1299-305
- Pooga M, Hallbrink M, Zorko M and Langel U: 1998, Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12(1), S.67-77
- Poon, R.T., Ngan, H., Lo, C.M., Liu, C.L., Fan, S.T. and Wong, J.: 2000, Transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma and postresection intrahepatic recurrence. *J Surg Oncol.* 73(2), S.109-14
- Porosnicu, M., Mian, A. and Barber, G.N.: 2003, The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. *Cancer Res.* 63(23), S.8366-76
- Porter, D.J.T. and Austin, E.A.: 1993, Cytosine Deaminase – The role of divalent metal ions in catalysis. *J Biol Chem.* 268(32), S.24005-24011

- Porter, D.J.T.: 2000, Escherichia coli cytosine deaminase: the kinetics and thermodynamics for binding of cytosine to the apoenzyme and the Zn²⁺ holoenzyme are similar. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1476, S.239-252
- Ramnaraine, M., Pan, W., Goblirsch, M., Lynch, C., Lewis, V., Orchard, P., Mantyh, P. and Clohisy, D.R.: 2003, Direct and bystander Killing of Sarcoma by Novel Cytosine Deaminase Fusion Gene. *Cancer Res*. 63, S.6847-6854
- Richards, C.A., Austin, E.A. and Huber, B.E.: 1995, Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. *Hum. Gene Ther*. 6, S.881-893
- Rogulski, K.R., Kim, J.H., kim, S.H. and Freytag S.O.: 1997, Glioma cells transduced with Escherichia coli CD/HSV-1TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum.Gene Ther*. 8, S.73-85
- Rojas M, Donahue JP, Tan Z and Lin YZ: 1998, Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol*. 16(4), S.370-5
- Rowley, S., Lindauer, M., Gebert, J.F., Haberkorn, U. Oberdorfer, F., Moebius, U., Herfarth, C. and Schackert, H.-K.: 1996, Cytosine deaminase gene as a potential tool for the genetic therapy of colorectal cancer. *J.surg.Oncol*. 61, S.42-48
- Ruiz, J., Qian, C., Drozdik, M. and Prieto, J.: 1999, Gene therapy of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepatol*. 6, S.17-34
- Ruiz, J, Mazzolini, G., Sangro, B. Qian, C. and Prieto, J.: 2001, Gene therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis*. 19, S.324-332
- Sakai, Y, Kaneko, S., Sato, Y., Kanegae, Y., Tamaoki, T., Saito, I., and Kobayashi, K.: 2001, Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with α -fetoprotein promoter and Cre/lox P system. *J Virol Meth*. 92, S.5-17
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York:, 1989 2nd Edition

- Sanger, F. and Coulson, A.R.: 1975, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 94, S.441-448
- Sama, C., Morselli Labate, A. and Barbara, L.: 1992, The role of liver transplantation in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Ital J Gastroenterol*. 24(3), S.139-43
- Schneider, H.B. and Becker, H.: 2003, Impact of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil treatment in cancer patients. *Eur.J.Med.Res*. 8(5), S.226-8
- Schröter, C. J., Braun, M., Englert, J., Beck, H., Schmid, H. and Kalbacher, H.: 1999, A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. *Journal of Immunological Methods*. 227, S.161-168
- Shariat, S.F., Desai, S., Song, W., Khan, T., Zhao, J., Nguyen, C., Foster, B.A., Greenberg, N., Spencer, D.M. and Slawin, K.M.: 2001, Adenovirus-mediated Transfer of Inducible Caspases. *Cancer Res*. 61, S.2562-2571
- Shiina, S., Teratani, T., Obi, S., Hamamura, K., Koike, Y. and Omata, M.: 2002, Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma: from percutaneous ethanol injection therapy and percutaneous microwave coagulation therapy to radiofrequency ablation. *Oncology*. 62 Suppl 1, S.64-8
- Silhol M, Tyagi M, Giacca M, Lebleu B and Vives E: 2002, Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat. *Eur J Biochem*. 269(2), S.494-501
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visitica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R.: 1990, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal National Cancer Institute*. 82, S.1107-1112
- Smith, L. and Beyers, J.F.: 2002, Gene therapy in the post-Gelsinger era. *JONAS Healthc Law Ethics Regul*. 4(4), S.104-10

- Steiner P., Brunken, C., Begemann, P. and Bücheler, E.: 2000, Transarterielle Chemoembolisation (TACE) und Thermoablation. *Der Internist.* **41**, S.198-204
- Sterneck, M.: 2000, Ätiologie des hepatozellulären Karzinoms. *Der Internist.* **41**, S.185-190
- Stöckl, L.: Charakterisierung der Bedeutung einer Zellpermeabilität vermittelnden Region für den Lebenszyklus des Hepatits B-Virus und Etablierung von zellpermeablen Nukleokapsiden für den Protein und Gentransfer. Hrsg.: Technische Universität München: 2002
- Stryer, L.: Biochemistry. Hrsg.: H.Freeman & Co.: 2002 4th edition
- Sugimachi, K., Maehara, S., Tanaka, S., Shimada, M. and Sugimachi, K.: 2001, Repeat hepatectomy is the most useful treatment for recurrent hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* **8(5)**, S.410-6
- Takamisawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S. and Murakami, S.: 1991, Structure and organisation of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol.* **65**, S.1105-1113
- Tang, Z.Y., Yu, Y. Q., Zhou, X.D. et al.: 1997, Three decades' experience in surgery of hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho.* **24 1**, S.126-133
- Tasciotti, E., Zoppe, M. and Giacca, M.: 2003, Transcellular transfer of active HSV-1 thymidine kinase mediated by an 11-amino-acid peptide from HIV-1 Tat. *Canc. Gene Ther.* **10**, S.64-74
- Tiraby, M., Cazaux, C., Baron, M., Drocourt, D., Reynes, J.-P. and Tiraby, G.: 1998, Concomitant expression of E.coli cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, S.41-49
- Topf, N., Worgall, S., Hackett, N.R. and Crystal, R.G.: 1998, Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther.* **5(4)**, S.507-13

- Trinh, Q., Austin, E. Murray, D. Knick, V. and Huber, B.: 1995, Enzyme/Prodrug gene therapy: Comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosin versus thymidine Kinase/Ganciclovir Enzyme/Prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 55, S.4808-4812
- Uckert, W., Kammertons, T., Haak, K., Qin, Z., Gerbert, J., Schendel, D.J. and Blankenstein, T.: 1998, Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells *in vivo*. *Hum. Gene Ther.* 9, S.855-865
- Van der Eb, M.M. et al.: 1998, Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus Thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Therapy.* 5, S.451-458
- Verma, I.M. and Somia, N.: 1997, Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature.* 389, S.239-242
- Vives E: 2003, Cellular uptake [correction of uptake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J Mol Recognit.* 16(5), S.265-71
- Vives E, Richard JP, Rispoli C and Lebleu B: 2003, TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry. *Curr Protein Pept Sci.* 4(2), S.125-32
- Wang, J., Yao, M., Zhang, Z., Gu, J., Zhang, Y., Li, B., Sun, L. and Liu X.: 2003, Enhanced suicide gene therapy by chimeric tumor-specific promoter based on HSF1 transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 546(2-3), S.315-20
- Wang, X.P., Yazawa, K., Yang, J., Kohn, D., Fisher, W.E. and Brunnicardi, F.C.: 2004, Specific gene expression and therapy for pancreatic cancer using the cytosine deaminase gene directed by the rat insulin promoter. *J Gastrointest Surg.* 8(1), S.98-108
- Wang, X.W., Hussain, S., Huo, T.-I., Wu, C.-G., Forgues, M., Hofseth, L.J., Brechot, C. and Harris, C.C.: 2002, Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology.* S.181-182

Wong, E.-T., Chew, Y.-P., Lee, L. and Lee, G.L.: 2002, Therapeutic Strategies for Hepatitis B virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Current Drug Targets*. 3(5), S.369-378

Wybranietz, W.: Potenzierung der Suizidgen-Wirkung durch VP22-Fusionsproteine. Hrsg.: Universität Tübingen: 2002

Wybranietz, W.A., Gross, C.D., Phelan, A., O'Hare, P., Spiegel, M., Graepler, F., Bitzer, M., Stahler, P., Gregor, M. and Lauer, U.M.: 2001, Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase (CD) fusion gene. *Gene Ther.* 8(21), S.1654-64

Xie, X., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, J., Matusik, R.J., Slawin, K.M. and Spencer, D.M.: 2001, Adenovirus-mediated Tissue-target Expression of a Caspase-9-based Artificial Death Switch for the Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 61, S.6795-6804

Yang, S., Delgado, R., King, S.R., Woffendin, C., Barker, C.S., Yang, Z.Y., Xu, L., Nolan, G.P. and Nabel, G.J.: 1999, Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther.* 10(1), S.123-32

Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenosin, in Sequenzen Adenosinmonophosphat
A	Absorption (dimensionslos)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5-triphosphat
bp	Basenpaare (base pair)
BSA	Rinder-Serum-Albumin
C	Cytidin, in Sequenzen Cytidinmono-phosphat
ca.	zirca
ccc	<i>covalently closed circular</i>
CI	Chloroform/Isoamylalkohol
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	<i>Cytomegalie</i> -Virus
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	DULBECCOs Modified EAGLE Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig, (<i>double stranded</i>)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid

5-FC	5-Fluorocytosin
fmol	femtomol = 10^{-9} mol
5-FU	5-Fluorouracil
G418	Genitacin (Neomycin Analogon)
g	Gramm
G	Guanosin, in Sequenzen Guanosimono-phosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBs	Hepatitis B Surface Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
hCMV	humanes <i>Cytomegalie Virus</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-Dithiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
K	Lysin
Kana	Kanamycin
Kana ^r	Kanamycin-Resistenz
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	mol/l, Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHBs	mittleres Hüllprotein des Hepatitis B-Virus
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Boten (<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
N	beliebige Base, in Sequenzen deren Monophosphat
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminotерminus
OD	optische Dichte
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pi	anorganisches Phosphat
PKC	Proteinkinase C
pmol	picomol = 10^{-12} mol

PVDF	Polyvinylendifluorid
PRPP	5-Phospho-ribosyl-1-pyrophosphat
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
sec, s	Sekunde
SHBs	mittleres Hüllprotein des Hepatitis B-Virus
SRB	Sulforhodamin B
ss	<i>single strained</i>
SV 40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin, in Sequenzen Thymin-monophosphat
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA (.../acetic acid/...)
TCA	Trichloroessigsäure (<i>trichloro acetic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLM	<i>translocation motif</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Uridin, in Sequenzen Uridimnonophosphat
U	Einheit enzymatischer Aktivität, <i>Unit</i>
ÜN	Übernacht
UPRT	Racil-Phospho-Ribosyl-Transferase
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Valin
v/v	Volumenprozent, (<i>volume per volume</i>)
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp, (<i>wild type</i>)
w/v	Gewichtsprozent, (<i>weight per volume</i>)

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2000 bis September 2003 in der Nachwuchsgruppe I am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eberhardt Hildt für die interessante Aufgabenstellung, für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen zur Anfertigung dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung und die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Krüger möchte ich für die freundliche Bereitschaft danken, die vorliegende Dissertation an der Humboldt-Universität in Berlin im Fachbereich Biologie zu vertreten.

Für die Begutachtung der Dissertation bedanke ich mich bei Prof. Dr. Uckert vom MDC Berlin und bei Prof. Dr. Pauli vom Robert-Koch-Institut Berlin.

Für die große Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich besonders bei meinen Laborkollegen Ramona und Lars Stöckl, Börries Brandenburg, Elke Bleifuss, Beate Malkowski, Hans Huser, Tilmann Bürckstümmer, Florian Löffelbein, Michael Schneider und Beate Friedrich sowie allen Kollegen, die mich im Zusammenhang mit dieser Arbeit fachlich unterstützt, inspiriert und weitergebracht haben, bedanken.

Danken möchte ich auch allen nicht namentlich genannten Helfern, die mich entweder aktiv oder passiv unterstützten.

Für ihre Geduld, ihr Verständnis und viele kleine und große Hilfeleistungen danke ich ganz herzlich meinem Mann Frank und meinen Eltern.

Vielen Dank.

Erklärung

Entsprechend der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin erkläre ich, dass

- ich mich an keinem anderen Ort um einen Doktorgrad beworben habe oder bereits einen solchen besitze,
- mir die genannte Promotionsordnung bekannt ist,
- ich die vorliegende Arbeit selbständig erarbeitet und verfasst habe und hierfür ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Annett Hillemann